



**UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA**

**Extracción, identificación, cuantificación de Ptaquilósido en leche de ganado vacuno que
pastorea en zonas donde crece *Pteridium arachnoideum***

**Autor: Danny Margarita Rosero Negrete
ma_ggi_r@gmail.com**

**Tesis para optar por el título profesional de
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**Tutora: Dra. Ximena Augusta Chiriboga Pazmiño
ximena.chiriboga@yahoo.com**

Quito, Mayo de 2013

Rosero Negrete, Danny Margarita (2013). Extracción, identificación, cuantificación de Ptaquilósido en leche de ganado vacuno que pastorea en zonas donde crece *Pteridium arachnoideum*. Trabajo de investigación para optar por el grado de Químico Farmacéutico. Carrera de Química Farmacéutica. Quito: UCE. 110 p.

DEDICATORIA

Colocar en una hoja a todas las personas importantes que han participado en mi vida es muy complicado, razón por la cual solo tengo que decir que esta tesis está dedicada para cada una de las personas que realmente me conoce y que siempre han creído en mí.

Primeramente quiero dedicar este trabajo a Dios, por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado la paciencia y salud necesaria para lograr una de mis metas.

Mi tesis también está dedicada a mis padres, por el apoyo que me han dado en los momentos buenos así como en los malos ratos y circunstancias difíciles.

Mamá, el ser que me dio la vida y que siempre tuvo una voz de aliento y un empujón para culminar este arduo trabajo, mi mamita este trabajo es por ti y para ti.

Papá, aquella persona que con su ejemplo me supo guiar, que con su comprensión supo entender momentos complicados de este largo trabajo y para lo cual nunca faltó un buen consejo, yo sé que para ti Diego siempre seré tu pequeña guambrita.

Buscar una razón para explicar el sentimiento que tengo hacia mi hermano, mis primos, mis mejores amigos, es complicado ubicar las alegrías y risas que me han dado, durante esta carrera tantos momentos compartidos, el escribir estas líneas es como volver a recordar y volver a estar con ustedes, situaciones únicas, difíciles y alegres, me hacen dedicar este trabajo a todas aquellas personas que siempre estuvieron ahí hasta el final.

Quiero dedicar esta tesis a mis maestros que han marcado cada etapa en mi camino universitario y me han brindado su ayuda y comprensión para la elaboración de esta tesis, así como también para las adversidades que se cruzaron en el largo sendero de mi carrera.

Finalmente, este trabajo va dedicado para todas aquellas personas especiales que confiaron en mí y que de una u otra manera me brindaron su amistad, animo, compañía y sobre todo cariño.

AGRADECIMIENTO

A la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador, porque en sus instalaciones pude desarrollar mi carrera y recibí el conocimiento que hoy me permite ser una profesional competente.

A mi tutora de tesis, Dra. Ximena Chiriboga por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación ha logrado en mí que pueda terminar mis estudios con éxito.

A mis padres, por toda su paciencia y amor que me supieron brindar en situaciones difíciles así como también en momentos de felicidad.

A mi hermano Diego, por toda su ayuda y preocupación para culminar este gran sueño.

A mis primos Santiago y Lizbeth, mis tíos y mis abuelos porque de parte de ellos nunca faltó una palabra de aliento, un abrazo, y un buen consejo para seguir con este arduo trabajo.

Quiero agradecer a mis amigos y amigas que sin ellos la vida de la universidad no hubiese sido la mismo, tantos momentos compartidos, penas, alegrías, conflictos pero siempre existe y existirá una verdadera amistad.

Un agradecimiento especial a mis amigos: Geomy, Jhon, Geova, Andrés, Kari, Vivi, Rose, Ire, Adry quien con ellos pude compartir circunstancias del diario vivir universitario, y nunca faltó la unión y un compromiso por salir bien de toda situación, a mis artoncitos que en ellos encontré una amistad muy pura y un compañerismo único.

Son muchas las personas que han formado parte de mi carrera universitaria a las que me encantaría agradecerles pero solo me queda por decirles que gracias a ustedes este sueño se cumplió.



**UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA**

Yo, Danny Margarita Rosero Negrete en calidad de autora del trabajo de investigación **Extracción, identificación, cuantificación de Ptaquilósido en leche de ganado vacuno que pastorea en zonas donde crece *Pteridium arachnoideum***, por la presente autorizo a la UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR, hacer uso de todos los contenidos que me pertenecen o de parte de los que contienen esta obra, con fines estrictamente académicos o de investigación.

Los derechos que como autor me corresponden, con excepción de la presente autorización, seguirán vigentes a mi favor, de conformidad con lo establecido en los artículos 5, 6, 8, 19 y demás pertinentes de la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.

Quito, a 14 de Marzo de 2013


Margarita Rosero Negrete
1712890183



UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA

Por la presente, dejo constancia que he leído la tesis presentada por la Señorita Danny Margarita Rosero Negrete, para optar por el título profesional cuyo tema es **Extracción, identificación, cuantificación de Ptaquilósido en leche de ganado vacuno que pastorea en zonas donde crece *Pteridium arachnoideum***, la misma que reúne los requerimientos, y los méritos suficientes para ser sometida a evaluación por el tribunal calificador.

En la ciudad de Quito, 14 de Marzo del 2013.


Dra. Ximena Chiriboga
170353946-8



UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA



INFORME DEL TRIBUNAL CALIFICADOR

Quito, 26 de Abril de 2013

Señor
Wilson Parra
DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Presente

Señor Decano:

El Tribunal encargado de calificar la Tesis

Extracción, identificación, caracterización de Plaguicidas
ante de ganado vacuno que pastorea en zonas donde
crece Plandium Arachnoideum

Presentada por: Dany Margrita Rosero Negrete

Estudiante de la Carrera de: Química Farmacéutica

luego del estudio y revisión correspondiente, resolvió:

APROBAR ☒ la Tesis con la NOTA de: diez y nueve (19/20)

y autorizar para que la escriba definitivamente.

REPROBAR ☐ la Tesis.

Es cuanto podemos informar.

Atentamente,

Dra. Ximena Chiriboga
170353946-8

Dra. Beatriz Vargas
050085511-3

Dr. Carlos Calderón
170262929-4

LUGAR DONDE SE REALIZARÁ LA INVESTIGACIÓN

La Investigación se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales y en el Laboratorio de Química Analítica Instrumental de la Facultad de Ciencias Químicas de La Universidad Central del Ecuador.

CONTENIDO

	pág.
LUGAR DONDE SE REALIZARÁ LA INVESTIGACIÓN.....	viii
CONTENIDO.....	ix
LISTA DE TABLAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMEN DOCUMENTAL.....	xv
SUMMARY.....	xvi
CAPITULO I.....	17
INTRODUCCIÓN.....	17
1.2 Planteamiento del problema.....	17
1.3 Formulación del problema.....	18
1.4 Objetivo general.....	18
1.5 Objetivos específicos.....	18
1.6 Importancia y justificación de la investigación.....	18
1.7 Hipótesis.....	19
CAPITULO II.....	20
MARCO TEÓRICO.....	20
2.1 Antecedentes.....	20
2.2 Fundamento teórico.....	21
2.2.1 Fundamento Botánico y Taxonómico <i>Pteridium arachnoideum</i>	21
2.2.1.1 Familia.....	21
2.2.1.2 Género.....	21
2.2.1.3 Especie.....	21
2.2.1.4 Nombre común.....	21
2.2.2 Descripción Botánica <i>Pteridium arachnoideum</i>	21
2.2.3 Hábitat y forma de vida de <i>Pteridium arachnoideum</i>	22
2.2.4 Compuestos químicos presentes en el género <i>Pteridium</i>	23
2.2.5 Efectos tóxicos del <i>Pteridium</i>	24
2.3 Características generales de Ptaquilósido.....	24
2.3.1 Estructura y propiedades de Ptaquilósido.....	24

2.3.2 Toxicidad de Ptaquilósido.....	25
2.3.3 Residualidad de Ptaquilósido en alimentos, leche, carne. Manifestaciones.....	26
2.4 Características generales de la leche.....	26
2.4.1 Definición.....	26
2.4.2 Propiedades físicas de la leche.....	27
2.4.3 Composición química de la leche.....	28
2.4.4 Propiedades microbiológicas de la leche.....	32
2.4.5 Propiedades nutricionales.....	34
2.4.6 Fisiología de producción de la leche.....	35
2.5 Hematuria enzoótica bovina.....	37
2.5.1 Introducción.....	37
2.5.2 Etiología de Hematuria enzoótica bovina.....	38
2.5.3 Epidemiología de Hematuria enzoótica bovina.....	39
2.5.4 Distribución mundial de Hematuria enzoótica bovina.....	40
2.5.5 Patogenia de Hematuria enzoótica bovina.....	40
2.5.6 Cuadros de Intoxicación de Hematuria enzoótica bovina.....	41
2.5.7 Lesiones.....	43
2.5.7.1 Lesiones macroscópicas.....	43
2.5.7.1 Lesiones microscópicas.....	44
2.5.7.1 Cambios proliferativos.....	44
2.6 Generalidades del Cáncer Gástrico en seres humanos.....	46
2.6.1 Partes del estómago.....	48
2.6.2 Capas de tejido del estómago.....	49
2.6.3 Sintomatología del cáncer gástrico.....	50
2.6.4 Factores de riesgo a cáncer gástrico.....	51
2.6.5 Epidemiología del cáncer gástrico.....	52
2.6.1 Diagnóstico del cáncer gástrico.....	54
2.6.2 Morfología y clasificación del cáncer gástrico.....	56
2.6.3 Patogenia del cáncer gástrico.....	60
2.6.4 Etapas del cáncer gástrico.....	63
2.7 Cromatografía- definiciones.....	66
2.7.1 Modalidades de la Cromatografía.....	67
2.7.2 Cromatografía-HPLC.....	69

2.7.3 Naturaleza de la fase móvil.....	72
2.7.4 La Naturaleza de la Fase Estacionaria.....	74
2.7.5 Sistemas de gradientes.....	74
CAPITULO III.....	76
METODOLOGÍA.....	76
3.1 Tipo de investigación.....	76
3.2 Población y muestra.....	76
3.2.1 Población.....	76
3.2.2 Muestra.....	76
3.3 Diseño experimental.....	76
3.4 Variables.....	77
3.4.1 Independiente.....	77
3.4.2 Dependientes.....	77
3.5 Técnicas e instrumentos analíticos.....	78
3.5.1 Metodología para la preparación del estándar.....	78
3.5.2 Metodología para la obtención de Ptaquilósido en muestras de leche.....	78
3.6 Instrumentos analíticos.....	80
CAPITULO IV.....	82
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	82
4.2 Análisis y discusión de resultados.....	82
4.2.1 Curva del estándar de Ptaquilósido.....	82
4.2.2 Resultados de la determinación de concentración de Ptaquilósido en muestras de leche.....	86
4.3 Interpretación de resultados.....	87
CAPÍTULO V.....	99
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	99
5.2 Conclusiones.....	99
5.3 Recomendaciones.....	100
6. Bibliografía.....	101
ANEXOS.....	106

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 2.1. Relación entre factores de riesgo del cáncer gástrico y su localización	52
Tabla 2.2. Rasgos endoscópicos diferenciales entre las lesiones ulceradas benignas y malignas.....	55
Tabla 2.3 Diagnóstico del cáncer gástrico.....	56
Tabla 2.4 Polaridad de solventes.....	73
Tabla 3.1 Alturas de recolección de muestras, Tratamientos.....	77
Tabla 3.2 Muestras de leche para cuantificación de Ptaquilósido.....	77
Tabla 4.1 Concentración final de las diluciones.....	83
Tabla 4.2 Relación de áreas obtenidas con respecto a la concentración de las diferentes diluciones del estándar de ptaquilósido.....	84
Tabla 4.3 Valores de Área de Ptaquilósido en muestras de leche, 1635 m.s.n.m.....	86
Tabla 4.4 Valores de Área de Ptaquilósido en muestras de leche, 1599 m.s.n.m.....	86
Tabla 4.5 Valores de Área de Ptaquilósido en muestras de leche, 1404 m.s.n.m.....	87
Tabla 4.6 Valores de área y Concentración de Ptaquilósido en muestras de leche, 1635 m.s.n.m...88	88
Tabla 4.7 Valores de concentración de Ptaquilósido en muestras de leche, 1635 m.s.n.m.....	88
Tabla 4.8 Valores de área y Concentración de Ptaquilósido en muestras de leche, 1599 m.s.n.m...89	89
Tabla 4.9 Valores de concentración de Ptaquilósido en muestras de leche, 1599 m.s.n.m.....	90
Tabla 4.10 Valores de área y Concentración de Ptaquilósido en muestras de leche, 1404 m.s.n.m...91	91
Tabla 4.11 Valores de concentración de Ptaquilósido en muestras de leche, 1404 m.s.n.m.....	91
Tabla 4.12 Concentración y áreas obtenidas de las diluciones iniciales del estándar de ptaquilósido.....	92
Tabla 4.13 Valores medios de área y concentración de Ptaquilósido en muestras de leche a las diferentes alturas.....	93
Tabla 4.14 Concentraciones de Ptaquilósido en un litro de leche.....	95
Tabla 4.15 Estadígrafos de posición y de dispersión, 1635 m.s.n.m.....	95
Tabla 4.16 Intervalos de confianza.....	96
Tabla 4.17. Estadígrafos de posición y de dispersión, 1599 m.s.n.m.....	96
Tabla 4.18 Tabla. Intervalos de confianza, 1599 m.s.n.m.....	96
Tabla 4.19 Estadígrafos de posición y de dispersión, 1404 m.s.n.m.....	97
Tabla 4.20 Intervalos de confianza, 1404 m.s.n.m.....	97
Tabla 4.21 Concentración de Ptaquilósido en muestras de leche a diferentes alturas.....	98
Tabla 4.22 Diseño experimental.....	98

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 2.1 <i>Pteridium arachnoideum</i>	21
Figura 2.2 <i>Pteridium arachnoideum</i> o helecho macho	22
Figura 2.3 Molécula de Ptaquilósido	24
Figura 2.4 Reacciones del Ptaquilósido en medio alcalino y ácido	25
Figura 2.5 Acido palmítico.....	30
Figura 2.6 Ácido butírico	30
Figura 2.7 Formación del azúcar lactosa.....	30
Figura 2.8 Estructura de glándula mamaria de la vaca	35
Figura 2.9 Alvéolos y conductos que forman el sistema secretor de leche	36
Figura 2.10 Hemangiomas vesicales.....	38
Figura 2.11 Hematuria	38
Figura 2.12 Carcinoma en la base de la lengua (a), Carcinoma en la entrada del rumen (b), Carcinoma de células escamosas (c).....	39
Figura 2.13 Hemorragia por la nariz (intoxicación aguda)	42
Figura 2.14 Expulsión de sangre por la orina.	43
Figura 2.15 Hemangiomas vesicales sangrantes.....	44
Figura 2.16 Nidos de Von Brunn´s	45
Figura 2.17 Cistitis glandular	45
Figura 2.18 Cistitis quística.....	46
Figura 2.19 Cistitis polipoide	46
Figura 2.20 Estómago aspecto.....	47
Figura 2.21 Partes del Estómago	48
Figura 2.22 Capas de tejido del estómago.....	49
Figura 2.23 Incidencias más altas en el mundo y Latinoamérica. Hombres.....	53
Figura 2.24 Tasas de incidencia estandarizada por 100000 habitantes en registros de cáncer del Ecuador 2003-2005 (H= hombre, M= mujeres)	54
Figura 2.25 Endoscopia.....	55
Figura 2.26 Bormann I	57
Figura 2.27 Barman II.....	58
Figura 2.28 Bormann III	58
Figura 2.29 Bormann IV	59

Figura 2.30 Carcinoma gástrico de tipo intestinal según Lauren.....	59
Figura 2.31 Carcinoma gástrico de tipo difuso según Lauren	60
Figura 2.32 Oncogenes.....	61
Figura 2.33 Genes supresores de tumores	62
Figura 2.34 Profundidad de la invasión de un carcinoma.	64
Figura 2.35 Diseminación del carcinoma a través de las capas del estómago y sus etapas.	65
Figura 2.36 Fase móvil y fase estacionaria de la cromatografía.....	66
Figura 2.37 Modalidades de la cromatografía.....	67
Figura 2.38 Movimiento de los distintos componentes de una muestra por la fase estacionaria.....	68
Figura 2.39 Esquema de HLPC	70
Figura 2.40 Gradiente de baja presión	75
Figura 2.41 Gradiente de alta presión	75
Figura 4.1 Estándar de Ptaquilósido	85
Figura 4.2 Concentración y área de Ptaquilósido en muestras e leche, altura 1635 m.s.n.m	89
Figura 4.3 Concentración y área de Ptaquilósido en muestras e leche, altura 1599 m.s.n.m.....	90
Figura 4.4 Concentración y área de Ptaquilósido en muestras e leche, altura 1404 m.s.n.m	92
Figura 4.5 Estándar de Ptaquilósido, ampliación de valores iniciales	93
Figura 4.6 Relación de la concentración de Ptaquilósido con la concentración media de Ptaquilósido en las muestras de leche recolectadas a las diferentes alturas.....	94
Figura 4.7 Relación de altura y Concentración de Ptaquilósido en muestras de leche.	94

RESUMEN DOCUMENTAL

El presente trabajo consiste en la evaluación de la presencia de ptaquilósido en muestras de leche de ganado vacuno que pastorea la zona de Tronador Grande Provincia de Bolívar, en donde se desarrolla la especie invasiva *Pteridium arachnoideum*.

Para la identificación y cuantificación de ptaquilósido, en las muestras de leche recolectadas, se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), valiéndose como estándar el ptaquilósido puro.

La investigación reveló que la concentración de ptaquilósido en las muestras de leche investigadas se hallan en un rango de 0.08mg/25ml a 1.0 mg/25ml; considerando que la investigación demostró la presencia de ptaquilósido en la leche, y que esta molécula es un agente carcinogénico y toxico que está relacionada con el cáncer gástrico en los seres humanos y la hematuria enzoótica bovina (HEB) en animales, se demuestra la importancia de este trabajo.

Descriptores:

PROVINCIA DE BOLÍVAR, *Pteridium arachnoideum* (HELECHO MACHO), LECHE DE VACA, PTAQUILÓSIDO, EFECTOS TÓXICOS, CÁNCER GÁSTRICO, HEMATURIA ENZOÓTICA BOVINA.

SUMMARY

The present work consists in evaluating the presence of ptaquilósido in milk samples from cattle that graze in the province of Bolívar Large Tronador where *Pteridium* develops invasively.

For the identification and quantification of ptaquilósido in milk samples collected, we used the technique of high performance liquid chromatography (HPLC), using as standard pure ptaquilósido.

The investigation revealed that ptaquilósido concentration in milk samples are investigated in a range of 0.08mg/25ml to 1.0 mg/25ml, considering that research showed the presence of ptaquilósido in milk, and that this molecule is an agent carcinogenic and toxic which is related to gastric cancer in humans and bovine enzootic hematuria (HEB) in animals, it demonstrates the importance of this work.

Descriptors:

BOLIVAR PROVINCE, *Pteridium arachnoideum* (MALE FERN), COW MILK, PTAQUILÓSIDO, TOXIC EFFECTS, GASTRIC CANCER, HEMATURIA LEUCOSIS BOVINE.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

1.2 Planteamiento del problema

El denominado helecho de potrero o helecho macho cuyo nombre científico es *Pteridium arachnoideum*, es una planta que al ser ingerida por equinos, ovinos y bovinos, les produce intoxicaciones agudas y crónicas, siendo estos comúnmente los animales más afectados. (Alonso-Amelot, 1999)

En su composición química el helecho presenta Ptaquilósido, sustancia que es potencialmente cancerígena, la misma que al ser ingerida por los animales produce tumores a nivel del aparato digestivo.

Investigaciones realizadas en la provincia de Jujuy, Argentina por M.V Raúl Evans demostró que en animales durante el pastoreo ingieren el helecho macho y que el Ptaquilósido es excretado en la leche, lo que determina que el consumo de esta tenga un alto riesgo para la salud humana. (Alonso-Amelot, 1999)

En estudios desarrollados según M. E. Alonso-Amelot et al. En 1998 en Bolivia, Perú, Venezuela y Costa Rica, demuestran la leche que contiene el Ptaquilósido en cantidad suficiente puede ser el causante o coadyuvante del alto índice de cáncer gástrico observado en las zonas montañosas de estos países, en donde este helecho es invasor de potreros que pastorea el ganado criado para la producción láctea. (Alonso-Amelot, 1999)

Estudios realizados en la Universidad del Zulia, Venezuela, en los rebrotes y en plantas jóvenes del *Pteridium*, que son consumidos inadvertidamente por los bovinos, provocan el desarrollo de tumores malignos en órganos del animal; de igual manera en Costa Rica, Jorge Villalobos Salazar, determinó que en zonas invadidas por *Pteridium*, el ganado que pastorea estos lugares, presenta una alta incidencia de hematuria enzoótica, efecto tóxico del Ptaquilósido en la especie bovina, se determinó además que existe una alta incidencia de cáncer gástrico en la población que consume la leche de estos animales.

Se ha demostrado que el medio alcalino, favorece la conversión del Ptaquilósido en dienona, compuesto responsable de alteraciones irreparables del núcleo de la célula, lo que determina el daño celular y consecuentemente la formación maligna de tumores. (Alfredo Sánchez-Villalobos João Paulo Elsen Saut, Octubre 2008)

1.3 Formulación del problema

En el país no existe estudios en los cuales se demuestre la presencia y posible concentración de Ptaquilósido en la leche de ganado vacuno, considerando la relación de este compuesto con el cáncer gástrico, por esta razón es necesario determinar si la leche de ganado vacuno de la provincia de Bolívar que durante el pastoreo ingiera *Pteridium arachnoideum* contiene Ptaquilósido y en la concentración que estaría presente.

1.4 Objetivo general

- Extraer, identificar y cuantificar Ptaquilósido en leche de ganado vacuno que pastorea zonas donde crece *Pteridium arachnoideum*.

1.5 Objetivos específicos

- Recolectar 15 muestras de leches de ganado vacuno que pastorea potreros en la zona de Tronador Grande, Provincia de Bolívar, a tres alturas diferentes.
- Extraer el Ptaquilósido que puede estar presente en las 15 muestras de leche recolectadas.
- Identificar por cromatografía la presencia de Ptaquilósido en las muestras de leche recolectadas en la zona de Tronador Grande, Provincia de Bolívar.
- Cuantificar el Ptaquilósido extraído en muestras de leche mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

1.6 Importancia y justificación de la investigación

En trabajos realizados por Evans en Inglaterra y por Villalobos-Salazar en Costa Rica demostraron el desarrollo de cáncer en ratones a los que se les administró leche de ganado, que consumió el helecho *Pteridium arachnoideum*, de igual manera investigaciones realizadas en Japón demostraron que existe una relación entre la incidencia de cáncer gástrico y el consumo directo del helecho por el ser humano, por otro lado se determinó también una relación con la incidencia de cáncer gástrico con personas que

consumen leche, subproductos cárnicos y lácteos de animales que tienen Hematuria Enzoótica Bovina (HEB). (Marrero Evangelina, 2012), (Delgado, Rojas, Tamayo, Jorgue, & Usma, 2009)

En Colombia, en las décadas de los setenta y ochenta se realizó estudios sobre los efectos del consumo de helecho macho en animales de experimentación (ratones, ratas y cobayos), demostrando que se produce HEB como efecto principal, de igual manera en Costa Rica se encontró que la población de las regiones altas, con potreros invadidos por el *Pteridium arachnoideum*, sufre una tasa de incidencia de cáncer de estómago 2,73 veces mayor que la de la población que habita en las zonas bajas donde los pastos están libres del helecho. (Delgado, Rojas, Tamayo, Jorgue, & Usma, 2009)

Según estudios realizados por Dra. Ángela Calderón durante Septiembre del 2010, en la provincia de Bolívar-Ecuador se identificó que el helecho *Pteridium arachnoideum* se encuentra en forma invasiva, al mismo tiempo se reporta la existencia de Hematuria Enzoótica Bovina, cuyo diagnóstico fue evaluado según los signos clínicos de intoxicación presentes en estos animales.

Del análisis anteriormente desarrollado así como la ausencia de reportes sobre la concentración de Ptaquilósido en leche de ganado vacuno, se planteó la investigación que tuvo por objeto realizar la identificación y cuantificación de este compuesto en muestras de leche de ganado vacuno tomado a tres alturas diferentes en la zona de Tronador Grande en la provincia de Bolívar.

1.7 Hipótesis:

Las muestras de leche de ganado vacuno que pastorea zonas donde crece *Pteridium arachnoideum* en la provincia de Bolívar, presentan Ptaquilósido.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

El género *Pteridium* es un diminutivo de *Pteris*, procedente del griego *pteron*, que significa ala, por la forma de las frondes u hojas. En el pasado, se lo consideraba al género con una sola especie, *Pteridium aquilinum*, pero ahora se subdivide en varias especies.

El *Pteridium arachnoideum*, especie conocida como helecho macho o de potrero, probablemente el helecho más distribuido en el mundo, excepto en la Antártica.

En el Ecuador se ha podido detectar esta especie especialmente en la provincia de Bolívar en la zona de Tronador Grande, se calcula que en el país existen alrededor de 1300 especies de pteridofitas (helechos), la mayoría de estas se encuentran en bosques nublados entre 1000 y 3000 m de altitud, son precisamente estas zonas actualmente invadidas por los helechos del Género *Pteridium* en donde comenzaron los casos clínicos de hematuria enzoótica en los vacunos, efecto tóxico que se presenta en los animales por el consumo de la planta, investigaciones realizadas demostraron que en el *Pteridium arachnoideum* está presente un compuesto tóxico llamado Ptaquilósido, molécula responsable de producir hematuria enzoótica en animales que en su pastoreo ingieren este helecho.

De la misma manera investigaciones posteriores demostraron que cuando el ganado vacuno pastorea zonas invadidas de *Pteridium* e inadvertidamente consumen este helecho, el Ptaquilósido pasa a la leche y cuando el ser humano consume esta leche, ingiere el compuesto.

2.2 Fundamento teórico

2.2.1 Fundamento Botánico y Taxonómico *Pteridium arachnoideum* (figura 2.1).



Figura 2.0.1 *Pteridium arachnoideum*. Por:
(Calderón Tobar, Marrero Faz, Murillo, & Vega, Oct.-
Dic. 2011)

2.2.1.1 Familia. Pteridophyta – Dennstaedtiaceae. (Gupta, 2008)

2.2.1.2 Género. Pteridium. (Gupta, 2008)

2.2.1.3 Especie. Arachnoideum. (Gupta, 2008)

2.2.1.4 Nombre común. Caramo, milile, mililí (Honduras)

Helecho macho, helecho águila, helecho de montaña. (Venezuela) (Ortega, 1991)

2.2.2 Descripción Botánica *Pteridium arachnoideum*. Se trata de un helecho con grandes frondes, de hasta 2 m de largo, que se disponen a intervalos, sobre rizomas subterráneos, muy profundos y ramificados. (Figura 2.2)



Figura 2.0.2 *Pteridium arachnoideum* o helecho macho. Por: (Moran R. , 2001)

Los últimos segmentos de las hojas o frondes tienen la base largamente decurrente y modificada (especialmente en las porciones media y proximal del penúltimo segmento); ejes de los penúltimos segmentos pelosos axialmente, nervaduras y tejido laminar entre las nervaduras densamente pelosas en el envés. (Moran R. , 2009)

Cada fronde presenta un pecíolo largo, bastante rígido y una lámina triangular de consistencia coriácea, muy dividida (3-4 pinnada) y pubescente en su cara inferior. Los esporangios se agrupan en soros que se disponen en el margen inferior de la hoja, hallándose cubiertos por una membrana (indusio) rudimentaria y además por el borde de la lámina que se pliega hacia abajo. (Moreno, 2009)

2.2.3 Hábitat y forma de vida de *Pteridium arachnoideum*. Es una planta ampliamente distribuida en todo el mundo, faltando exclusivamente en áreas desérticas, subdesérticas y territorios polares.

En Argentina, crece en las provincias del norte y centro, alcanzando su límite más austral en Buenos Aires y Córdoba. En esta última, habita en varias zonas (actualmente en expansión) de las

Sierras Grandes, encontrándose en ambientes variados como valles y laderas, prosperando tanto en condiciones umbrías y húmedas.

Todas las especies del género *Pteridium* son invasoras en ecosistemas perturbados, cultivos, potreros y bordes de caminos, esto se debe a varias razones, entre ellas:

- La resistencia del sistema rizomatoso a condiciones adversas.
- La rápida invasión mediante esporas en las áreas perturbadas, ya que su reproducción es asexual, siendo a través de esporas contenidas en esporangios ubicados en las frondes. La producción de esporas y diseminación de estas, kilómetros a la redonda depende directamente de las condiciones climatológicas y ambientales del lugar donde se desarrolla la planta.
- Sus propiedades alelopáticas que impiden el establecimiento de otras especies vegetales. (Moreno, 2009)

Varios países del mundo han encaminado proyectos para el control que incluyen la quema de las plantas, remoción del follaje y el trozado de los rizomas, sin embargo, no se han reportado, resultados concluyentes acerca de la eficacia de su aplicación y erradicación de la especie.

2.2.4 Compuestos químicos presentes en el género *Pteridium*. La planta entera contiene bencenoides, esteroides, taninos, flavonoides, vitaminas, saponinas, catecol, alicíclicos, esteroides y/o terpenos.

La hoja contiene alcaloides, alcanos, bencenoides, carotenoides, esteroides, proteidos, proteidos, tiaminasa, treonina, sesquiterpenos, taninos, pterosina a, pterosina b, derivados de Ptaquilósido, alicíclicos, cumarinas, fenilpropanoides, fenilalanina, flavonoides, isoleucina, arginina y ácido hidrociánico.

El rizoma contiene carbohidratos, taninos, alcaloides, sesquiterpenos, aceite esencial y estructuras desconocidas. La raíz contiene carbohidratos y esteroides. (Ortega, 1991)

2.2.5 Efectos tóxicos del *Pteridium*. Entre los efectos más importantes relacionados con el consumo del helecho tenemos los siguientes:

- Deficiencia de Vitamina B1 (tiamina): el consumo de *Pteridium* produce la deficiencia de Vitamina B1 (tiamina) en equinos o porcinos, ocasionando espasmos musculares, dificultades respiratorias y finalmente la muerte. (Alfredo Sánchez-Villalobos João Paulo Elsen Saut, Octubre 2008)
- Además produce Degeneración progresiva del neuroepitelio de la retina: patología denominada ceguera despierta de las ovejas, debido a que estos animales se quedan ciegos por estrechamiento de vasos sanguíneos en la retina, lo que origina que las pupilas estén dilatadas y muestren escasos reflejos a la luz, razón por la cual los animales no se mueven pero se mantienen despiertos y alertas. (Alfredo Sánchez-Villalobos João Paulo Elsen Saut, Octubre 2008)

2.3 Características generales de Ptaquilósido

2.3.1 Estructura y propiedades de Ptaquilósido. El Ptaquilósido fue aislado por primera vez en 1983 (Niwa, Ojika, Wakamatsu, Yamada, Hirono, & Matsushita, 1983), desde el punto de vista químico es un glucósido serquiterpenico con anillo ciclopropano, cuyo esqueleto es de tipo iludano y que se encuentra en forma glicosidada unida a una molécula de glucosa, cuya estructura es:

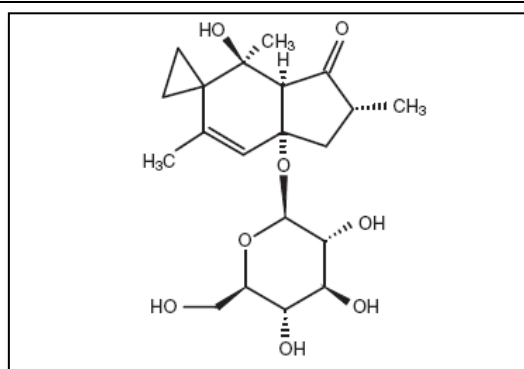
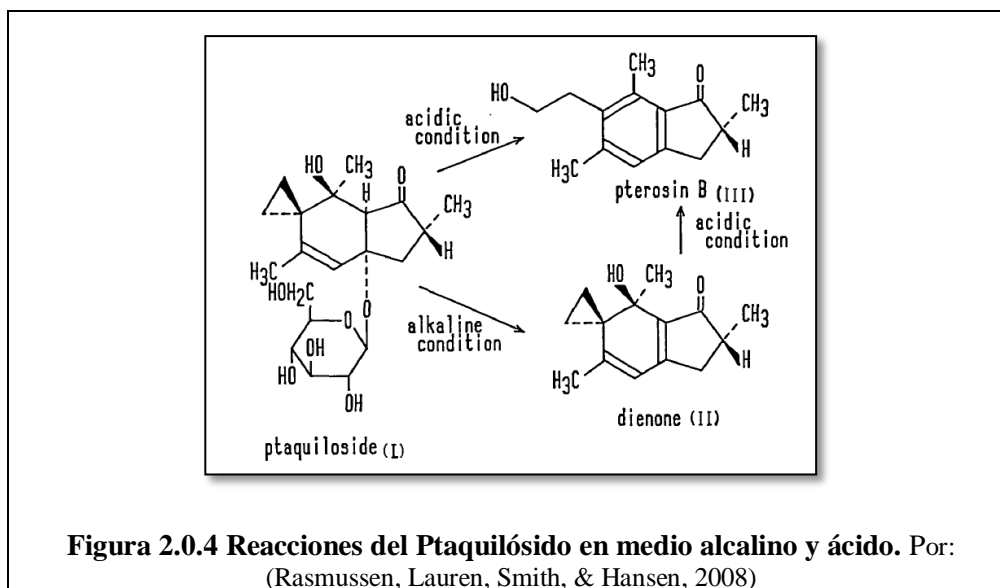


Figura 2.0.3 Molécula de Ptaquilósido. Por: (Rasmussen, Lauren, Smith, & Hansen, 2008)

Es un sólido inestable, amorfo e incoloro, termolábil.

El Ptaquilósido en solución acuosa y en presencia de ácido, base o calor, se degrada rápidamente a un compuesto conocido como pterosina B, en tanto que en medio alcalino se descompone a un compuesto químico denominado dienona, como puede observarse en la siguiente figura:



La dienona es un compuesto altamente alquilante, debido a su carácter electrofílico puede reaccionar rápidamente con aminoácidos, nucleósidos y nucleótidos. (Peredo, 2010)

La dienona forma uniones covalentes, además es capaz de formar ductos de residuos de adenina y guanina provocando así la ruptura de la base de adenina en el codón 61 y finalmente se depurina causando un error en la síntesis de ADN originando la formación de neoplasias. (Peredo, 2010)

2.3.2 Toxicidad de Ptaquilósido. El Ptaquilósido en 1983 fue descrito como un potente carcinógeno radiomimético genotóxico, es el principal carcinógeno de entre 100 metabolitos aislados del género *Pteridium*, esto se debe a la capacidad de inducir la formación de tumores en la vejiga urinaria de bovinos. Sin embargo, otros metabolitos como quercetina y tiamina también han manifestado a nivel vesical efectos carcinogénicos y mutagénicos. (Evans, 1976)

Especialmente en Japón, los rizomas y frondes jóvenes han sido empleados como alimento, la ingesta de las frondes, el consumo de la leche producida por las vacas que ingieren esta planta como forraje y además por inhalación o ingestión de sus esporas, han sido consideradas las posibles vías de exposición del hombre al compuesto, de igual manera se ha comprobado que la ingestión del helecho por equinos, ovinos y bovinos causa intoxicaciones (hematuria enzoótica bovina), razón por la cual durante las dos últimas décadas ha sido objeto de preocupación y estudio su capacidad carcinogénica.

2.3.3 Residualidad de Ptaquilósido en alimentos, leche, carne. En Bolivia en la zona montañosa del Chaco húmedo, el helecho ocupa más del 50 % de la biomasa consumible por el ganado, causando pérdidas económicas por el sacrificio prematuro de animales, ya que hay fuertes evidencias de que el Ptaquilósido presente en el helecho se acumula en los tejidos del animal y se excreta por la leche, causando lesiones cancerígenas en distintas manifestaciones. (Stuart, Marrero, Sánchez, Bulnes, & Palenzuela, 2006)

Especialmente el Ptaquilósido se ha encontrado en la leche de bovinos, razón por la cual es la principal vía de exposición del humano a los carcinógenos del *Pteridium Arachnoideum*, se ha podido demostrar según Villalobos-Salazar los niveles de Ptaquilósido en la leche, encontrándose que el compuesto aparece 54 horas después de la ingesta del *Pteridium Arachnoideum*, alcanza el pico de mayor concentración a las 78 horas y disminuye en un 50% a las 115 horas; la pasteurización y la cocción disminuyeron los niveles de Ptaquilósido en la leche en un 47% y un 74% respectivamente. (Marrero Evangelina, 2012)

2.4 Características generales de la leche

2.4.1 Definición. La leche es una secreción de las hembras de los mamíferos, cuya misión es satisfacer los requerimientos nutricionales por el recién nacido, además la leche se le considera también como un producto íntegro, no adulterado, y sin calostros, obtenido del ordeño higiénico, regular y completo de una hembra lechera. (Gil, 2010)

Es una secreción nutritiva de color blanquecino opaco producida por las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos. La principal función de la leche es la de nutrir a los hijos de las crías hasta que son capaces de digerir otros alimentos.

La leche de los mamíferos domésticos como de vaca, oveja, cabra, yegua, forma parte de la alimentación principal de ser humano.

2.4.2 Propiedades físicas de la leche

- **Densidad.** La densidad de la leche puede variar entre 1.028 a 1.034 g/cm³ a una temperatura de 15°C; la misma que varía en 0.0002 g/cm³ por aumento de cada grado de temperatura. (Nasanovsky, Garijo, & Kimmich, 2010)

La densidad de la leche varía de los valores anteriormente indicados según sea su composición, debido a que depende de la concentración de los componentes, los mismos que son los siguientes:

- Agua: 1.000 g/cm³.
- Grasa: 0.931 g/cm³.
- Proteínas: 1.346 g/cm³.
- Lactosa: 1.666 g/cm³.
- Minerales: 5.500 g/cm³.

La densidad mencionada (entre 1.028 y 1.034 g/cm³) es para una leche entera, pues la leche descremada está por encima de esos valores alrededor de 1.036 g/cm³, mientras que una leche aguada tendrá valores menores de 1.028 g/cm³. (Nasanovsky, Garijo, & Kimmich, 2010), esto se debe a la variación de la cantidad de materia grasa que existe en la leche, ya que la densidad de la grasa (0.931 g/cm³) es inferior a la densidad de agua (1.00 g/cm³), por lo tanto hay que tomar en cuenta la concentración de materia grasa para considerar la densidad de la leche. (Gil, 2010)

- **pH de la leche.** La leche tiene un pH característico cercano al neutro. Su pH puede variar entre 6.5 y 6.8, estos valores de pH se incrementan debido al deficiente estado sanitario de la glándula mamaria; el desarrollo de microorganismos transforma la lactosa en ácido láctico produciendo una disminución del pH, en tanto que la presencia de microorganismos alcalinos se produce un incremento de pH. (Nasanovsky, Garijo, & Kimmich, 2010)

- **Acidez de la leche.** La acidez de la leche está dada por la cantidad de ácido láctico que puede neutralizarse con una solución alcalina titulada, el indicador que generalmente se utiliza para determinar esta propiedad es la fenolftaleína, el resultado de esta determinación se expresa habitualmente en grados Dornic (D), 1°D equivale a la presencia de 0.1g de ácido láctico en un litro de leche. (Gil, 2010)

La acidez es una medida indirecta de la población microbiana presente en la leche, de esta manera se revela las condiciones que ha sido obtenida y almacenada, por lo tanto la leche obtenida a condiciones higiénicas, tiene una acidez de 15°D o 15%. (Gil, 2010)

Una acidez menor al 15% puede deberse a la presencia de mastitis (infección de la glándula mamaria), al aguado de la leche o a una alteración provocada con algún producto alcalino, en tanto que la acidez superior al 16% es producida por la contaminación microbiológica. (Nasanovsky, Garijo, & Kimmich, 2010)

- **Viscosidad.** La viscosidad de la leche entera esta entre 1.7 a 2.2 cp (centi poise), mientras que una leche descremada tiene una viscosidad de alrededor de 1.2 cp. (Nasanovsky, Garijo, & Kimmich, 2010)

La viscosidad de la leche disminuye con el aumento de la temperatura hasta aproximadamente 70°C, por encima de esta temperatura aumenta el valor de la viscosidad.

- **Punto de congelación.** El punto de congelación de la leche está entre -0.513°C y -0.565°C, siendo el valor promedio de -0.54°C, menor al punto de congelación del agua, esta diferencia se debe a la presencia de las sales minerales y de la lactosa. (Nasanovsky, Garijo, & Kimmich, 2010), debido a que la leche contiene una buena concentración de estas sustancias, por lo que su punto de congelación presentará un descenso directamente proporcional a la concentración de dichas sustancias. (Gil, 2010)

2.4.3 Composición química de la leche. La leche es un líquido de composición compleja, se puede aceptar que está formada aproximadamente por un 13 % de sólidos lácteos totales, y el 87% restante corresponde al agua. (Gil, 2010)

La composición porcentual de los sólidos más comúnmente hallada es la siguiente:

- Materia grasa (lípidos): 3.5% a 4.0%
- Lactosa: 4.7% (aprox.)
- Sustancias nitrogenadas: 3.5% (proteínas entre ellas)
- Minerales: 0.8%

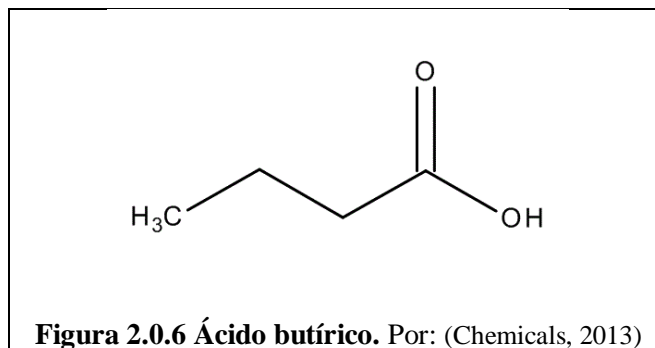
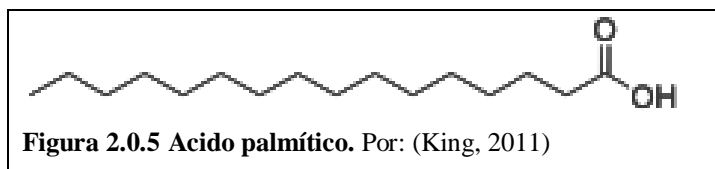
El agua es el soporte de los componentes sólidos de la leche, se encuentra presente en dos estados: como agua libre que la que está en mayor proporción y como agua adsorbida en la superficie de los componentes. (Nasanovsky, Garijo, & Kimmich, 2010)

Los porcentajes anteriormente indicados corresponden a la composición más común de la leche, sin embargo no se puede determinar con exactitud los mismos debido a que esta depende de una serie de factores, incluso si la leche proviene de la misma vaca puede variar su composición, esto hace que no todas las leches sean iguales así como sus propiedades.

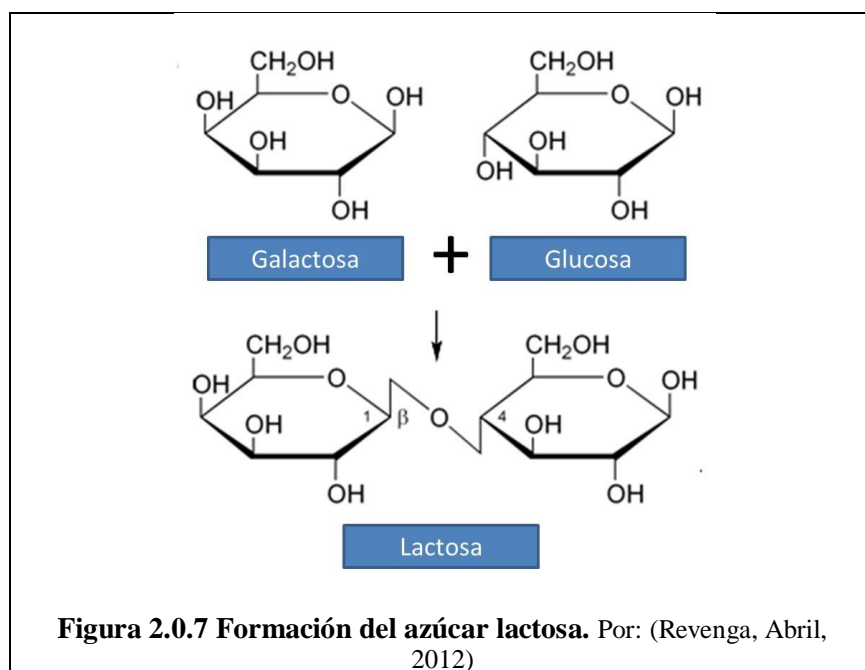
- **Agua.** La cantidad de agua presente en la leche puede variar en un 80% y 90%, y es regulada por la lactosa, azúcar que se sintetiza en las células secretoras de la glándula mamaria. El agua que va en la leche es transportada a la glándula mamaria por la corriente circulatoria. (Wattiaux, 1994)
- **Lípidos o grasa.** La cantidad de lípidos que puede tener la leche está comprendida entre 2.8% y 4%, este porcentaje varía según la raza de bovino y su estado de nutrición. (Wattiaux, 1994)

Los lípidos de la leche de vaca están constituidos principalmente por triglicéridos en un 97%; el 3% restante corresponde a fosfolípidos y esteroides, especialmente colesterol.

Los triglicéridos abarcan, un 60 a 70% de ácidos grasos saturados, entre los cuales tenemos ácidos grasos de punto de fusión elevado como: ácido palmítico (figura 2.5), ácido esteárico, pero también de ácidos grasos de cadena corta: butírico (figura 2.6), capríco, cúprico y círllico; estos dan el aroma que se percibe al momento de hervir la leche. (Nasanovsky, Garijo, & Kimmich, 2010)



- **Azúcares.** El azúcar que se encuentra en la leche en cantidad importante es la lactosa (figura2.7), su valor esta alrededor de 4,5-5.2% y actúa principalmente como fuente de energía. (Wattiaux, 1994)



Químicamente, la lactosa es un disacárido de glucosa y galactosa

- **Sustancias minerales.** La cantidad de minerales en la leche varía entre 0.8% y el 1%, siendo los más importantes el calcio, el fosforo y el potasio, minerales que se encuentran en una

concentración muy superior a la concentración que existe en la leche del ser humano. (Nasanovsky, Garijo, & Kimmich, 2010)

- **Proteínas de la leche.** La mayor parte del nitrógeno de la leche se encuentra en la forma de proteína, cuya concentración varía de 3.0% a 4.0% (30-40 gramos por litro), este porcentaje varía con la raza de la vaca y en relación con la cantidad de grasa en la leche.

Las proteínas se clasifican en dos grandes grupos: caseínas con un 80% y proteínas séricas con un 20%.

Las caseínas son moléculas de gran tamaño que contienen un gran número de aminoácidos, entre los cuales los más importantes son el ácido glutámico, la leucina y la propina, las caseínas se agrupan en forma de polímeros constituidos por miles de moléculas individuales, a estos complejos se les denomina micelas de caseína, las cuales están constituidas por subunidades micelares de 10-20nm de diámetro.

Existen varios tipos de caseínas: la α -caseína, la β -caseína, la κ -caseína y la caseína D, el comportamiento de estas en la leche al ser tratada con calor, a diferente pH y a diferentes concentraciones de sal, proporciona las características a los diferentes productos lácteos (quesos, leche condensada, leche en polvo). (Wattiaux, 1994)

Por otra parte las proteínas séricas se las define como las proteínas que quedan en solución cuando el pH de la leche se lleva hasta 4,6, es decir, cuando la caseína se precipita para la elaboración de quesos, razón por la cual estas proteínas no forman parte de los quesos maduros, además son proteínas sensibles al calor, de manera que cuando se somete la leche a tratamientos térmicos, parte de las proteínas del suero se desnaturalizan. (Gil, 2010)

Entre las proteínas del suero se distinguen: α -lactoalbúmina, β -lactoalbúmina, albumina sérica, proteasas-peptonas, inmunoglobulinas y otras proteínas. (Gil, 2010)

- **Vitaminas de la leche.** Las vitaminas son sustancias orgánicas que en cantidades suficientes permiten el crecimiento, el mantenimiento y el funcionamiento del organismo. La leche figura entre los alimentos que contienen la variedad más completa de vitaminas, sin embargo éstas se encuentran a menudo en pequeñas cantidades. (Gil, 2010)

Tradicionalmente, las vitaminas se clasifican en dos grupos según su solubilidad en el agua o en las grasas. Así, las vitaminas A, D, E, y K son liposolubles encontrándose en su totalidad en la

crema y mantequilla, mientras que las vitaminas B y C son hidrosolubles y permanecen en la leche descremada. (Stwar, 2011)

- **Vitaminas liposolubles.**

Estas vitaminas se caracterizan por ser resistentes al calor, se las puede encontrar en la grasa.

El contenido de las vitaminas liposolubles son: vitamina A (100 a 500 mg/litro); vitamina D (2 mg/litro); vitamina E (500 a 1000 mg/litro); vitamina K (solo hay trazos). (Nasanovsky, Garijo, & Kimmich, 2010)

- **Vitaminas hidrosolubles.**

Se hallan en la fase acuosa, la más abundante es la vitamina B₁ (tiamina o aneurina) su concentración es de 400 a 1000 mg/litro y la vitamina B₂ (riboflavina o lactoflovina) su concentración es de 800 a 3000 mg/litro; vitamina B₁₂ (cianocobalamina) está presente en muy pequeñas cantidades y la vitamina C (ácido ascórbico) su concentración es de 10 a 20 mg/litro, esta vitamina es destruida con el calor. (Nasanovsky, Garijo, & Kimmich, 2010)

- **Enzimas de la leche.** Otros componentes de la leche incluyen a las enzimas, las principales enzimas que se encuentran en la leche son: lipasa, proteasa y fosfatasa alcalina, estas hidrolizan triglicéridos, proteínas y ésteres fosfato, respectivamente.

La leche contiene numerosas enzimas, pero su estudio es difícil pues no es posible siempre separar fácilmente las enzimas naturales de la leche, de las que son producidas por los microorganismos presentes en ella. (Vaclavik, 2002)

2.4.4 Propiedades microbiológicas de la leche. La leche contiene pocas bacterias al extraerla de la ubre de una vaca sana, sin embargo, durante el ordeño la leche se puede contaminar a partir del animal, especialmente de las zonas externas de la ubre y áreas próximas del medio ambiente. Probablemente las dos fuentes de contaminación más significativas sean el equipo y utensilios, utilizados para su obtención y recolección, así como las superficies que entran en contacto con la leche, incluidas las manos de los ordeñadores y demás personal.

La leche recién obtenida es un sustrato ideal para un gran número de géneros bacterianos, algunos beneficiosos y otros perjudiciales, que provocan alteraciones diversas del alimento y sus propiedades.

El número de microorganismos presentes en la leche varía de cuarto a cuarto y de vaca a vaca, dependiendo de los sistemas de limpieza y desinfección utilizados; cuando es obtenida en condiciones asépticas, oscila entre 100 y 1,000 UFC/mL. En la práctica, la leche recién obtenida contiene de 1,000 a 10,000 UFC/mL, constituidos por contaminantes procedentes del entorno de la ubre, el equipo de ordeño y los ordeñadores. (Spreer, 2011)

- **Tipo de bacterias en la leche:**

Los grupos microbianos más importantes en Lactología pueden dividirse, desde un punto de vista funcional, en:

- Bacterias lácticas.
- Bacterias propiónicas.
- Bacterias butíricas
- Bacterias patógenas

- **Bacterias lácticas.** Son las bacterias que convierten mediante la fermentación, la lactosa en ácido láctico.

Pueden generar una alteración en la consistencia, como *Lactobacillus bulgaricus*, que puede hacer espesar la leche, paso principal para elaborar yogurt. Genera que el porcentaje de acidez suba y el pH baje a 4.5, para su desarrollo se requiere de temperaturas ya sea ambientales o superiores. (Spreer, 2011)

- **Bacterias propiónicas.** Estas bacterias generan liberación de dióxido de carbono (CO₂), actúan sobre las trazas de ácido propiónico de la leche para generar ácido acético. Pueden generar un exceso burbujeante sobre la leche y dar un olor excesivamente ácido, requieren de temperaturas de 24 °C para comenzar a actuar. (Spreer, 2011)

- **Bacterias butíricas.** Las bacterias butíricas generan coágulos grasos en la leche no acidificada. La alteración de la grasa puede generar un espesor muy poco deseado, requieren un pH superior a 6.8. (Spreer, 2011)

- **Bacterias patógenas.** Estas bacterias alteran todas las propiedades. La acidez disminuye, el pH comienza a hacerse básico, existe una separación irregular de las grasas, el olor se hace pútrido. Su presencia, como la de coliformes, puede indicar contaminación fecal. Estas bacterias producen liberación de CO₂ y dióxido de nitrógeno (NO₂); generando burbujas grandes.

Requieren de temperaturas de 37 °C y de acidez baja. Usualmente, la leche fuera de refrigeración experimenta estos cambios. (Spreer, 2011)

- **Bacterias psicrófilas.** Durante la pasteurización se eliminan la mayor cantidad de este tipo de gérmenes, sin embargo, estos dejan una enzima llamada proteasa, que resiste a las altas temperaturas provocando en las leches un sabor amargo característico, cuando ha cumplido el 50% del tiempo de su caducidad.

Estas bacterias para su desarrollo requieren un grado de acidez y valor de pH menor a 6.6, no son inhibidas por el congelamiento. (Spreer, 2011)

2.4.5 Propiedades nutricionales. La diversificada composición de la leche de vaca, en la que entran grasas, proteínas, (caseína, albúmina y proteínas del suero) y glúcidos (lactosa, azúcar específica de la leche), la convierten en un alimento completo. Además, la leche entera es una importante fuente de vitaminas (vitaminas A, B, D3, E).

La vitamina D es la que fija el fosfato de calcio a dientes y huesos, por lo que es especialmente recomendable para niños. El calostro es un líquido de color amarillento, rico en proteínas y anticuerpos, indispensables para la inmunización del recién nacido. A pesar de ello, no tiene aplicación industrial. (Gil, 2010)

Aspectos nutricionales:

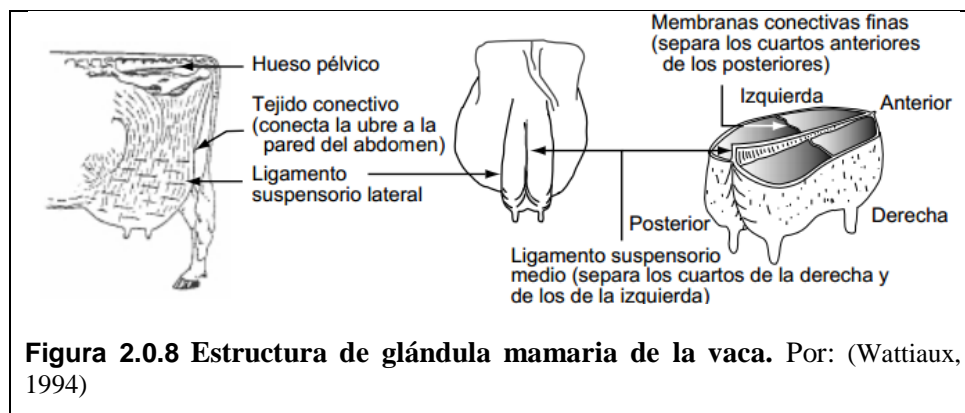
- **Proteínas.** La leche es un alimento muy rico en proteínas capaz de cubrir las necesidades de aminoácidos de nuestro organismo, además de su alto papel nutricional, posee un gran papel potencial como factor y modulador del crecimiento. (Gil, 2010)

- **Agua.** En todos los animales, el agua es el nutriente requerido en mayor cantidad y la leche suministra una gran cantidad de agua, conteniendo aproximadamente 90% de la misma. (Wattiaux, 1994)
- **Vitaminas.** La leche es fuente importante de vitaminas para niños y adultos. La ingesta recomendada de vitaminas del grupo B (B1, B2 y B12) y un porcentaje importante de las A, C y ácido pantoténico se cubre con el consumo de un litro de leche. (Gil, 2010)

2.4.6 Fisiología de producción de la leche. La secreción de leche es un proceso continuo, el aumento de la presión de la leche una vez que están llenos los alveolos, provoca que la secreción disminuya, y finalmente se detenga. Por tanto es necesario ordeñar con intervalos regulares de tiempo (dos veces al día) y sacar toda la leche acumulada cada vez que se ordeña. (Wattiaux, 1994)

- **Estructura de la glándula mamaria:**

La ubre de la vaca es conocida como una glándula exocrina, debido a que la leche es sintetizada en células especializadas agrupadas en alvéolos, y luego excretada fuera del cuerpo por medio de un sistema de conductos, está localizada en la región inguinal, se encuentra suspendida por fuera de la pared del abdomen posterior y no se encuentra fijada, soportada o protegida por ninguna estructura ósea, como indica la figura 2.8.



Está constituida por cuatro glándulas mamarias o "cuartos". Cada cuarto es una unidad funcional en sí misma que opera independientemente y drena la leche por medio de su propio canal. Generalmente, los cuartos posteriores son ligeramente más desarrollados y producen más leche (60%) que los cuartos anteriores (40%). (Wattiaux, 1994)

Cada glándula consta de:

- Parénquima glandular donde se produce la leche.
- Sistema excretorio que está compuesto por los conductos lácteos y la cisterna de la glándula que termina en el canal galactóforo del pezón.
- Sistema intersticial, formado por una red de tejido conjuntivo en la cual van incluidos los vasos sanguíneos, y linfáticos y los nervios del órgano.

Separando la piel de la ubre y el parénquima glandular esta una capa de tejidos graso, llamado “cuerpo adiposo capsular”. El grosor de esta capa depende del estado funcional de la ubre.

- Conductos y sistema secretor de leche

El alvéolo es la unidad funcional de producción en la que una sola capa de células secretoras de leche se encuentra agrupada en una esfera con una depresión en el centro (Figura 2.9). Los capilares sanguíneos y células mioepiteliales (células similares a las musculares) rodean el alvéolo, y la leche secretada se encuentra en la cavidad interna (lumen). (Wattiaux, 1994)

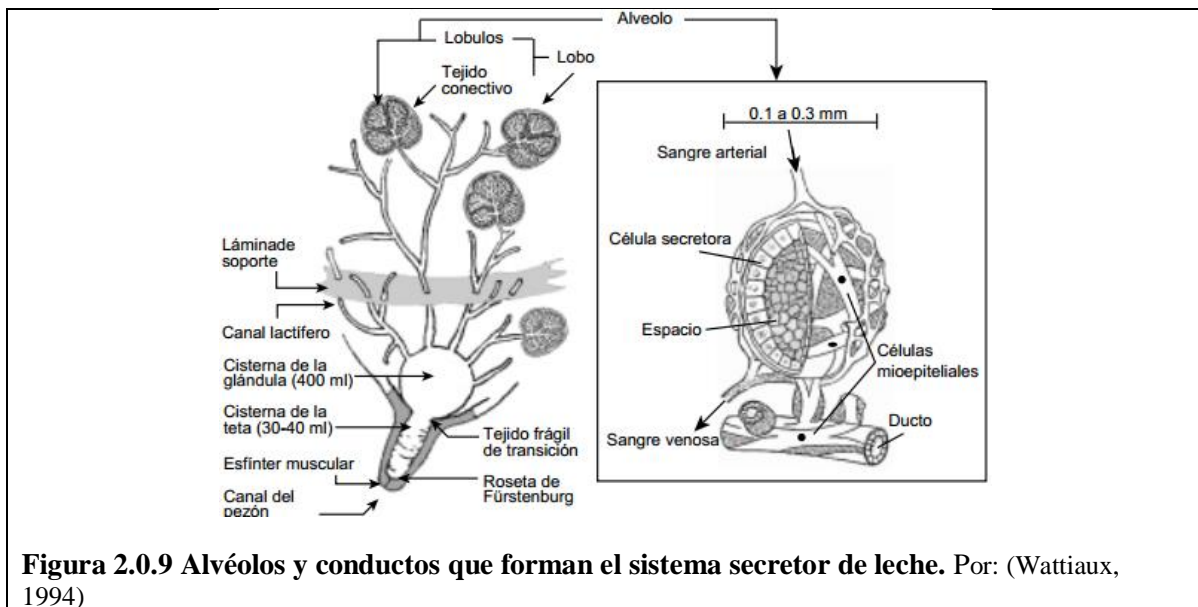


Figura 2.0.9 Alvéolos y conductos que forman el sistema secretor de leche. Por: (Wattiaux, 1994)

Las principales funciones del alvéolo es remover los nutrientes de la sangre, para poder transformar estos en leche, y posteriormente descargar la leche dentro del lumen o cavidad interna.

El conjunto de 10 a 100 alvéolos forman un lóbulo estos se encargan de drenar la leche por medio de un conducto en común. Los lóbulos descargan la leche dentro de un conducto colector de mayor tamaño que conduce a la cisterna de la glándula, que descansa directamente encima del pezón de la glándula como indica la figura 2.9.

Por tanto la ubre está formada por millones de alvéolos donde se secreta la leche.

Los conductos forman canales de drenaje en los que la leche se acumula entre los ordeños, sin embargo, es solamente cuando las células mioepiteliales que recubren el alvéolo y que los pequeños conductos se contraen en respuesta a la hormona oxitocina (reflejo de bajada de leche) que la leche fluya dentro de los tubos galactóforos y hacia la cisterna de la glándula, para poder ser extraída posteriormente por el pezón. (Wattiaux, 1994)

2.5 Hematuria enzoótica bovina

2.5.1 Introducción. La hematuria enzoótica bovina, conocida como la intoxicación por Ptaquilósido es un proceso patológico que afecta a bóvidos de pastoreo, debido a que están expuestos al consumo continuo del *Pteridium arachnoideum* y por largos períodos de tiempo; la hematuria está circunscrito a zonas geográficas montañosas que se encuentran desde los 600 y 2000 metros sobre el nivel del mar (msnm), el síndrome conocido como Pteridiosis es la forma clínica de la hematuria enzoótica.

La Pteridiosis: es producida por la ingestión masiva del helecho *Pteridium arachnoideum*, durante varias semanas, el principio tóxico, llamado Ptaquilósido, actúa sobre la médula ósea disminuyendo el proceso mediante el cual, se generan las plaquetas, es decir, se ve afectado la trombopoyesis, que es el proceso encargado de promover la coagulación de la sangre para impedir su pérdida en caso de una lesión vascular, por tanto el Ptaquilósido produce trombocitopenia (disminución de plaquetas) y diátesis hemorrágica.

Los síntomas son de dos tipos:

- En animales adultos se desarrolla la forma intestinal, con anorexia, fiebre, melena, diarrea, diátesis hemorrágica, hematuria, anemia, granulocitopenia y trombocitopenia.
- Los terneros, en cambio, se ven afectados por la forma laríngea, que cursa con depresión, descarga nasal mucosa, disnea, edema de glotis, las hemorragias son menores a las que se observan en los bóvidos adultos.

La hematuria enzoótica bovina se debe al carácter carcinógeno del principal compuesto presente en el helecho denominado Ptaquilósido, el cual genera los procesos neoplásicos y no neoplásicos los mismos que pueden tener un origen epitelial o vascular. Los de origen vascular generalmente se trata de hemangiomas cuya localización típica es en la vejiga (figura 2.10), estos tumores al romperse producen un sangrado que origina la hematuria (figura 2.11).

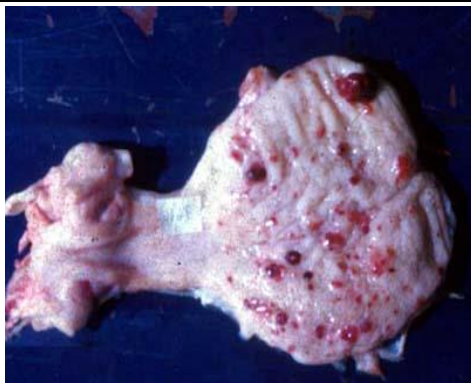


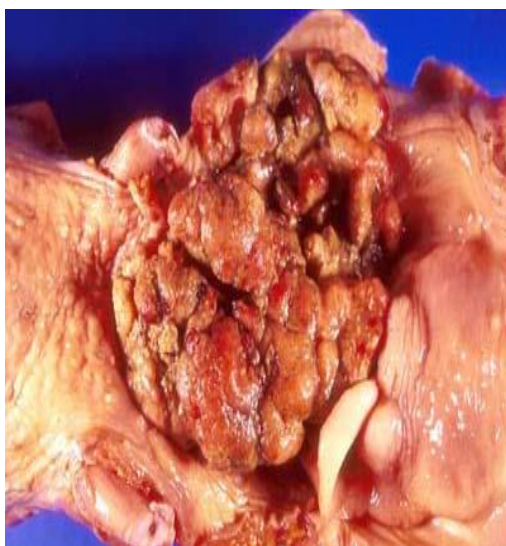
Figura 2.0.10 Hemangiomas vesicales. Por: (Delgado, Rojas, Tamayo, Jorgue, & Usma, 2009)



Figura 2.0.11 Hematuria. Por: (Delgado, Rojas, Tamayo, Jorgue, & Usma, 2009)

2.5.2 Etiología de Hematuria enzoótica bovina. La principal causa de la hematuria enzoótica bovina es la ingestión continua y por largos períodos de *Pteridium arachnoideum*, debido a que la planta tiene una amplia distribución mundial.

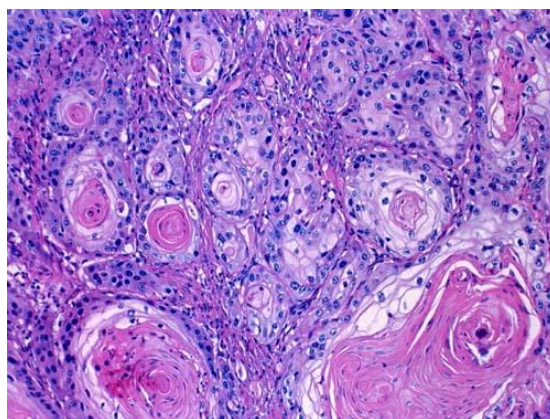
De acuerdo a estudios en Inglaterra, Kenya y Brasil, se ha relacionado como posible etiología de la hematuria a infecciones con virus de la familia *papovaviridae*, especialmente a la transformación maligna del Papiloma virus bovino tipo 4 (BPV4) que produce la presencia de neoplasias carcinomatosas de la nasofaringe, esófago. (Figura 2.12). (Peredo, 2010)



(a)



(b)



(c)

Figura 2.0.12 Carcinoma en la base de la lengua (a), Carcinoma en la entrada del rumen (b), Carcinoma de células escamosas (c). Por: (Delgado, Rojas, Tamayo, Jorgue, & Usma, 2009)

2.5.3 Epidemiología de Hematuria enzoótica bovina. La hematuria enzoótica bovina es una enfermedad que ha sido reportada en los cinco continentes del mundo, es causada principalmente por *Pteridium arachnoideum*, entre los animales que son afectados tenemos los bovinos, ovinos y búfalos de agua, siendo estos los animales que pastorean y son expuestos al consumo del helecho durante un tiempo aproximado de dos años, por esta razón es un gran impacto económico para las regiones ganaderas donde se presenta la enfermedad. (Guzmán, 2010)

2.5.4 Distribución mundial de Hematuria enzoótica bovina. La principal causa de esta enfermedad es el consumo durante el pastoreo de *Pteridium arachnoideum*, planta que ha sido considerada como la de mayor extensión global en el planeta, su distribución parece estar limitada por altitud, latitud y clima.

Considerando que la Hematuria enzoótica bovina se relaciona con el consumo del helecho, razón por la cual se ha observado en numerosos países tan diversos como Nueva Zelanda, Brasil, Suecia, Inglaterra, Canadá y las islas Fiji, siendo los más afectados Venezuela y Costa Rica.

En América, vemos que a esta enfermedad en Costa Rica es denominada “Orinadera de sangre”, en Colombia y Argentina como “Meadera de sangre”, en Venezuela “Vejigazo”, y en Brasil “Intoxicación por samambaia”. (Peredo, 2010)

2.5.5 Patogenia de Hematuria enzoótica bovina. El principal factor para el desarrollo de neoplasias en la vejiga urinaria de los rumiantes es el consumo directo del helecho (*Pteridium arachnoideum*), debido a que en su composición existe un compuesto carcinógeno (ptaquilósido) responsable del proceso en las intoxicaciones crónicas.

El signo clínico característico de los casos más graves se demuestran por la expulsión de sangre por la orina, muchas veces en forma de coágulos, dando lugar a un empeoramiento progresivo del estado del animal debido a una anemia hemorrágica. Es importante resaltar las lesiones presentes en la pared de la vejiga, estas se muestran como crecimientos tumorales que son fuente de hemorragias.

El proceso que se lleva a cabo una vez que sea consumida la planta es liberar el Ptaquilósido, el cual podría ser parcialmente absorbido, sin embargo, una proporción llegará al abomaso (cuarto y último compartimento del estómago), enfrentándose al medio ácido y al ataque enzimático, que destruirá una parte del Ptaquilósido, mientras que otra se progresará en el intestino delgado donde será absorbido por las vellosidades, incorporándose al torrente sanguíneo, para luego distribuirse a otros órganos, como hígado, riñón, músculo esquelético, glándulas mamarias, vejiga urinaria. (Rebhum, 1995)

El pH alcalino de la orina (pH 8) facilita la conversión del Ptaquilósido en dienona, una poderosa sustancia tóxica alquilante; a nivel celular la dienona traspasa la membrana celular y nuclear, se une químicamente a proteínas con terminal amino expuesto como el ADN e interacciona con el átomo de nitrógeno de una base, modificando bases nitrogenadas y de fosfato.

De este proceso resultará el fraccionamiento del DNA y como consecuencia se afecta la regulación de la apoptosis en células defectuosas o neoplásicas que están a cargo del gen p53, por lo que se le ha denominado "guardián del genoma", provocando un excesivo aumento de su expresión en células, esto conduce a la inestabilidad genética celular y posteriormente a la oncogénesis, tras la activación del oncogen H-ras (interruptor-regulador molecular), produciendo errores durante la síntesis del ADN y ocasionando mutaciones somáticas. (Rebhum, 1995)

En la vejiga donde se presente neoplasias serán focos de ulceración, los que producirán severas hemorragias y van a provocar que la orina se combine con la sangre total y el animal muestre un cuadro clínico de hematuria.

Por otro lado, bajo condiciones ligeramente ácidas, el Ptaquilósido se transforma en una sustancia denominada pterosina B, que no posee actividad carcinogénica. De manera similar, la dienona tóxica cuando reacciona con aminoácidos que contienen sulfuros, se convierte en una indanona no tóxica, que tampoco posee actividad carcinogénica, con lo cual existe una manera para detoxificar el Ptaquilósido utilizando aminoácidos que contienen sulfuros.

2.5.6 Cuadros de Intoxicación de Hematuria enzoótica bovina. Los signos clínicos de hematuria enzoótica bovina manifestados en el animal dependen del grado de intoxicación con *Pteridium arachnoideum*, existen bovinos con lesiones sin presencia de hematuria, mientras que otros presentaron hematuria sin mostrar lesiones macroscópicas en la vejiga.

2.5.6.1 Intoxicación aguda. Los síntomas iniciales en animales afectados por hematuria enzoótica bovina muestran la piel floja y seca, los principales signos son fiebre elevada, diarrea importante con posible presencia de sangre en las heces, suelen apreciarse hemorragias por la nariz (figura 2.13), ojos y vagina.



Figura 2.0.13 Hemorragia por la nariz (intoxicación aguda). Por: (Rebhum, 1995)

El principal signo de intoxicación aguda es una pancitopenia, además se presenta:

- Anemia de tipo aplásico con descenso del número de glóbulos rojos.
- Leucopenia (granulocitopenia y neutropenia)
- Trombocitopenia notable y aumento del tiempo de coagulación.

Otros signos de intoxicación son:

- Aumento del número de transaminasas ya que se trata de una intoxicación.
- En la orina presencia de sangre.

2.5.6.2 Intoxicación crónica. El principal signo clínico de los casos más graves se demuestran por la expulsión de sangre por la orina (figura 2.14), muchas veces en forma de coágulos.



Figura 2.0.14 Expulsión de sangre por la orina. Por: (Marin, 1997)

La hematuria puede continuar en el tiempo (incluso meses) y dar lugar a un empeoramiento progresivo del estado del animal debido a una anemia hemorrágica. Es importante resaltar la lesiones presentes en la pared de la vejiga de la orina. Estas lesiones se muestran como crecimientos tumorales que son fuente de hemorragias.

2.5.7 Lesiones

2.5.7.1 Lesiones macroscópicas. En la hematuria enzoótica bovina el órgano más afectado principalmente es la vejiga urinaria, se caracteriza por presentar cambios macroscópicos como edema y engrosamiento de la pared, acompañado por coágulos sanguíneos u orina teñida de sangre. (Figura 2.15).

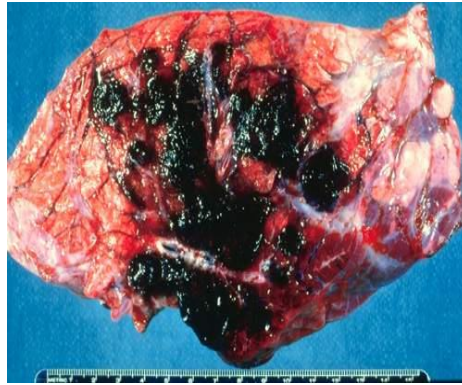


Figura 2.0.15 Hemangiomas vesicales sangrantes.
Por: (Delgado, Rojas, Tamayo, Jorgue, & Usma, 2009)

En la vejiga urinaria también se encuentran focos hemorrágicos puntiformes hasta pequeñas superficies rojas a negras; en casos avanzados se presenta proliferaciones de la mucosa con el aspecto de coliflor. (Guzmán, 2010)

Además, las lesiones pueden incluir también petequias y equimosis ampliamente distribuidas, especialmente sobre el corazón, riñones y otras superficies serosas, sobre las mucosas, músculos y tejido subcutáneo. (Guzmán, 2010)

2.5.7.2 Lesiones microscópicas. Las lesiones microscópicas se presentan principalmente en la vejiga urinaria, y se consideran patognomónicas debido a que no existe otra patología en los bovinos que produzca una imagen histopatológica similar. Las alteraciones o lesiones que se pueden presentar son hiperemia, infiltrados leucocitarios, edema, hemorragias, úlceras, separación del endotelio vascular y cambios proliferativos de la mucosa.

2.5.7.3 Cambios proliferativos. Los cambios proliferativos son anomalías epiteliales de la mucosa de la vejiga urinaria que se identifica en los animales afectados por la hematuria enzoótica bovina, las cuales han sido descritas y agrupadas de la siguiente manera:

Nidos de Von Brunn's: son grupos compactos de células epiteliales de transición, las cuales están agrupándose unas a otras en la lámina propia con o sin conexión hacia el epitelio superficial, en ocasiones se puede presentar cistitis quística y metaplasia glandular. (Díaz, Betancourt, Blanco, & García, 1999)

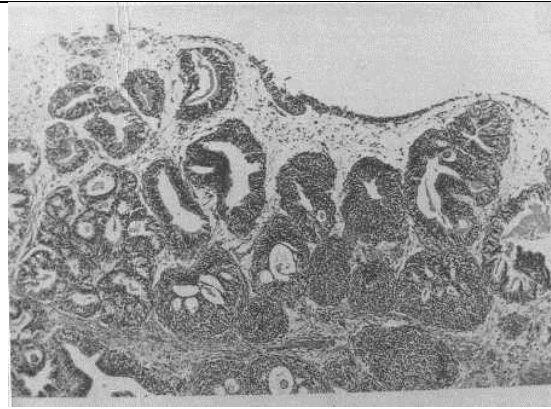


Figura 2.0.16 Nidos de Von Brunn's. Por: (Díaz, Betancourt, Blanco, & García, 1999)

Cistitis glandular o metaplasia glandular: está caracterizada por células epiteliales columnares que contienen moco, ya sea sobre la superficie o formando glándulas en la lámina propia. (Díaz, Betancourt, Blanco, & García, 1999)



Figura 2.0.17 Cistitis glandular. Por: (Díaz, Betancourt, Blanco, & García, 1999)

Cistitis quística: Son agrupaciones de células epiteliales transicionales, donde se pueden observar algunos quistes uniéndose en la lámina propia con o sin conexión a la superficie de la mucosa. (Díaz, Betancourt, Blanco, & García, 1999)



Figura 2.0.18 Cistitis quística. Por: (Díaz, Betancourt, Blanco, & García, 1999)

Cistitis polipoide: Son formaciones de epitelio hiperplásico, que se proyectan en forma de dedos desde la lámina propia. Las proyecciones son edematosas, hiperémicas y están infiltradas con células inflamatorias. (Díaz, Betancourt, Blanco, & García, 1999)

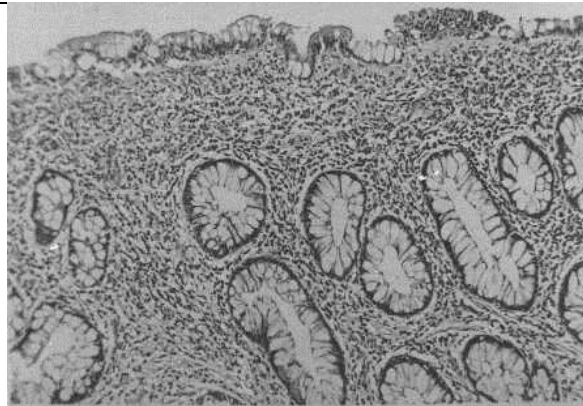


Figura 2.0.19 Cistitis polipoide. Por: (Díaz, Betancourt, Blanco, & García, 1999)

2.6 Generalidades del Cáncer Gástrico en seres humanos:

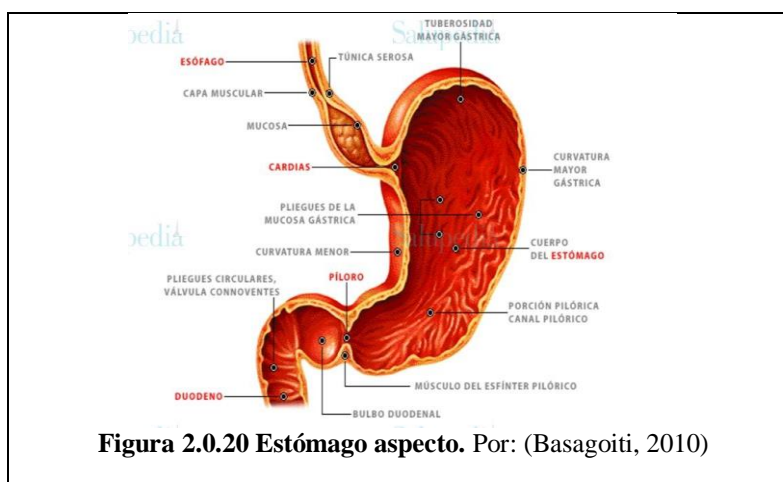
El cáncer gástrico o de estómago es un tipo de crecimiento celular maligno producido por la proliferación de células anormales con invasión local hacia los tejidos, órganos y metástasis

sistémica, entre las neoplasias gástricas más comunes tenemos el adenocarcinoma y el carcinoma, el primero es el cáncer del tubo digestivo, este afecta fundamentalmente a las glándulas segregativas de las paredes del estómago y el carcinoma es el tipo de cáncer más común, que se manifiesta como una masa irregular con una úlcera céntrica profunda que penetra las paredes estomacales.

El cáncer de estómago puede extenderse de la pared del estómago al esófago o al intestino delgado, de igual manera algunos órganos también se ven afectados por el cáncer y puede extenderse a través de la pared del estómago a los nódulos linfáticos próximos, afectando así al hígado, páncreas y al colon o bien puede extenderse a órganos distantes, como los pulmones; el nuevo tumor tiene la misma clase de células anormales y el mismo nombre que el tumor primario, es decir, si el cáncer de estómago se extiende al hígado, las células de cáncer en el hígado son las mismas que las células del cáncer de estómago y la enfermedad se llama cáncer gástrico metastático a hígado. (Nuñez, Peña, Montiel, Villalva, Pazos, & Diaz, 2011)

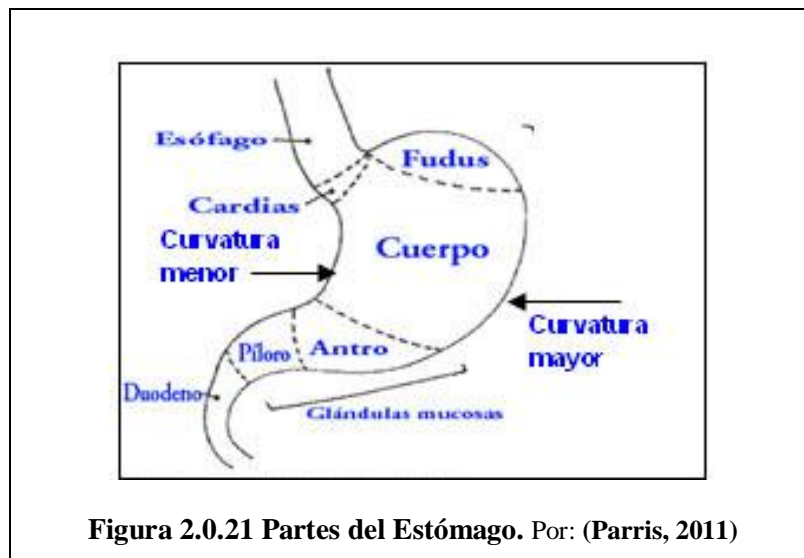
El estómago es un órgano en forma de “J” como se representa en la figura 2.20, está ubicado en la sección superior del abdomen, entre el extremo del esófago y el principio del intestino delgado, mide aproximadamente 25cm desde el cardias hasta el píloro y el diámetro transversal es de 12cm.

La función del estómago es procesar los alimentos consumidos, estos alimentos avanzan desde la garganta al estómago a través de un tubo muscular denominado el esófago, para que posteriormente los alimentos digeridos ingresen al intestino delgado y luego al intestino grueso.



2.6.1 Partes del estómago. Las principales partes del estómago son:

- **Curvaturas del estómago:** El lado izquierdo del estómago se conoce como la curvatura menor y el lado derecho se conoce como la curvatura mayor. (Figura 2.21) (Parris, 2011)
- **Cardias:** El cardias es la sección superior del estómago, es el sitio donde desembocan los alimentos masticados. (Figura 2.21) (Parris, 2011)
- **Fundus:** El fundus es la porción del estómago que se encuentra cerca de la curvatura mayor (figura 18), se ubica en la porción izquierda del cuerpo separado del resto del cuerpo por un plano que pasa horizontalmente a través del orificio cardiaco. (Figura 2.21) (Parris, 2011)



- **Cuerpo:** el cuerpo es la principal región o parte central del estómago. (Figura 2.21) (Parris, 2011)
- **Píloro:** el píloro es la sección inferior del estómago, la misma que se subdivide por la presencia del surco intermedio en porción pilórica y el antro pilórico. (Figura 2.21). (Parris, 2011)

2.6.2 Capas de tejido del estómago. Las capas de tejido que conforman la pared del estómago (figura 2.22) son: la capa interna o mucosa, la capa submucosa, la capa media o muscular y la capa externa o serosa. El cáncer de estómago se origina en las células que recubren la capa de la mucosa y se disemina a través de las capas externas.

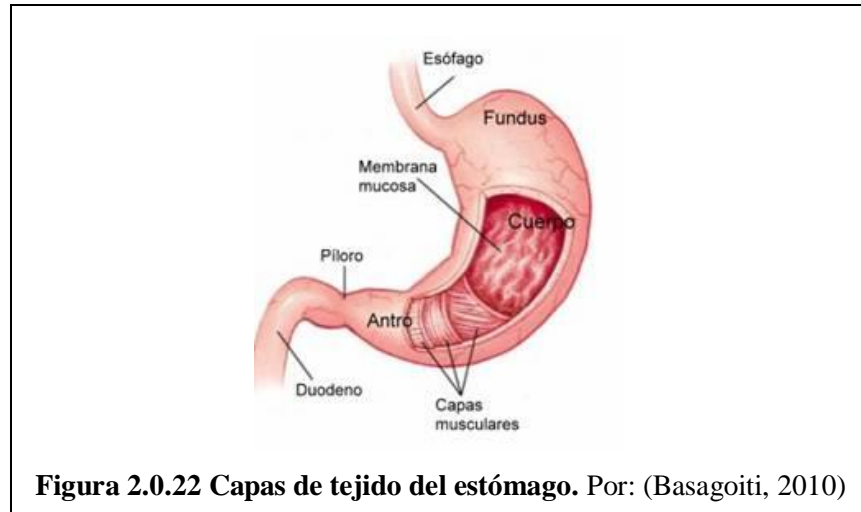


Figura 2.0.22 Capas de tejido del estómago. Por: (Basagoiti, 2010)

- **Capa mucosa:** La capa mucosa del estómago presenta a su vez tres subcapas:
 - El epitelio
 - La lámina propia de la mucosa
 - La lámina muscular de la mucosa
- **Epitelio superficial:** el epitelio se encuentra en el cardias, y se distingue una gruesa capa de moco gástrico en polo apical de las células, que sirve de protección contra el ácido estomacal y las enzimas gástricas. (Napa, 2003)
- **Lámina propia de la mucosa:** la lámina propia de la mucosa está formada por tejido conectivo laxo, posee glándulas secretoras de mucus y enzimas. (Napa, 2003)
- **Lámina muscular de la mucosa:** la lámina muscular de la mucosa es una capa de fibras de músculo liso, por la presencia de esta lámina la mucosa del estómago e intestino delgado presenta numerosos pliegues pequeños, los cuales incrementan el área de superficie para la digestión y la absorción. (Napa, 2003)

- **Capa muscular:** La capa muscular gástrica puede considerarse como el músculo gástrico porque debido a sus contracciones o movimientos peristálticos el bolo alimenticio se mezcla con los jugos gástricos y se desplaza hacia el píloro. (Napa, 2003)
- **Capa serosa:** La capa serosa, está formada por tejido conectivo laxo recubierto por una capa epitelial llamado mesotorio y está envuelve totalmente al estómago. (Napa, 2003)

2.6.3 Sintomatología del cáncer gástrico. El cáncer gástrico o cáncer de estómago, es difícil de establecer, debido a que en la mayoría de los casos no existen síntomas y cuando se presentan son muy leves, confundiendo así al paciente con otras afecciones y despreocupándose por ellos.

Sin embargo, los principales síntomas que pueden presentarse son los siguientes:

- Dolor o llenura abdominal
- Indigestión o una sensación ardiente
- Malestar o dolor abdominal
- Náuseas y vómitos
- Diarrea o estreñimiento
- Hinchazón del estómago después de comidas
- Pérdida del apetito
- Debilidad y fatiga
- Sangrados inhabituales
- Cambios en el ritmo intestinal o urinario
- Heridas que tardan en cicatrizar
- Dificultad en ingerir alimentos
- Tos persistente o ronquera
- Pérdida de peso (involuntaria)
- Mal aliento

Cualquiera de estos síntomas puede ser causado por el cáncer o por otros problemas de salud como puede ser una úlcera o una infección, factores que en un tiempo posterior serán posibles causantes del cáncer gástrico. Por tanto, solamente un médico gastroenterólogo evaluará y determinará exactamente el diagnóstico correcto, el paciente con molestias digestivas duraderas que con tratamiento no mejora, debe ser valorado por Oncólogo. (Sierra, 2002)

2.6.4 Factores de riesgo a cáncer gástrico. Numerosos son los factores de riesgo que se asocian con la aparición del cáncer gástrico en determinadas regiones del mundo; algunos permanecen en discusión y otros se han consolidado con el tiempo.

Entre los factores asociados con el cáncer se ha podido determinar: la infección por *Helicobacter pylori* como principal causa, ya que el riesgo de desarrollar cáncer se incrementa 3-6 veces con un período de latencia de 15-20 años, la hipoclorhidria y la migración del epitelio del intestino delgado a estómago, la combinación de estos factores determina una gastritis crónica con cambios displásicos y para finalizar en un adenocarcinoma gástrico, de igual manera otros factores de riesgo implicados también se incluyen: tabaco, alimentos salados, productos con alto contenido de nitritos, que por acción bacteriana se convierten en nitrosaminas que es un agente cancerígeno altamente conocido, además un bajo consumo de grasas y proteínas, dieta pobre en fruta y verduras frescas, baja ingesta de vitaminas A y C. (Sierra, 2002)

De la misma manera, se ha descrito algunos de los factores genéticos que influyen al cáncer de estómago como la anemia perniciosa (deficiencia del factor intrínseco por tanto disminución de vitamina B12), personas con el tipo de sangre A, historia familiar con esta enfermedad, Gastritis atrófica, metaplasia intestinal y displasia, Enfermedad de Menetrier que tiene un 10% de asociación con cáncer gástrico. (Lopez Santalla, 2006)

La mayor incidencia de cáncer gástrico actualmente es en Japón, China, Europa del Este, Costa Rica, México, Chile, Colombia y Venezuela, estas diferencias geográficas no sólo se atribuyen a razones relacionadas con la calidad del diagnóstico y el tratamiento, sino que están influenciadas por factores que difieren en las diversas poblaciones del planeta. (Piñol, 1998) según estudios de migración existe un aspecto interesante, se aprecia que en los emigrantes procedentes de países de alta incidencia de cáncer gástrico, la enfermedad se comporta como en las personas de los países receptores, es decir, se aprecia una significativa disminución de su incidencia en los emigrados, contraria lo que ocurre cuando la migración es a la inversa. (Lopez Santalla, 2006)

En la siguiente tabla 2.1 se presenta un resumen relacionando los factores de riesgo del cáncer gástrico y su localización.

Tabla 2.1 Relación entre los factores de riesgo del cáncer gástrico y su localización

Factores de riesgo	Localización		
	Antral (porción distal del estómago)	Cuerpo del estómago	Fundus (porción superior del estómago)
Edad	Mayores de 50 años	Menores de 50 años	Menores de 35 años
Sexo	Frecuente en hombres	Disparidad de sexo	Hombres, raza blanca
<i>Helicobacter Pylori</i>	Adquirido en la niñez	Asociación poco frecuente	No se asocia
Histología	Bien diferenciado	Indiferenciado o difuso con invasión submucosa extensiva.	64 % son pobremente diferenciados. 17 % son bien diferenciados.
Metástasis	Frecuentemente hepáticas.	Tempranas	No se reportan
Clasificación de Bormann	Tipo Bormann I	Tipo Bormann IV	Tipo Bormann I (polipoideo).

Nota: (Piñol, 1998)

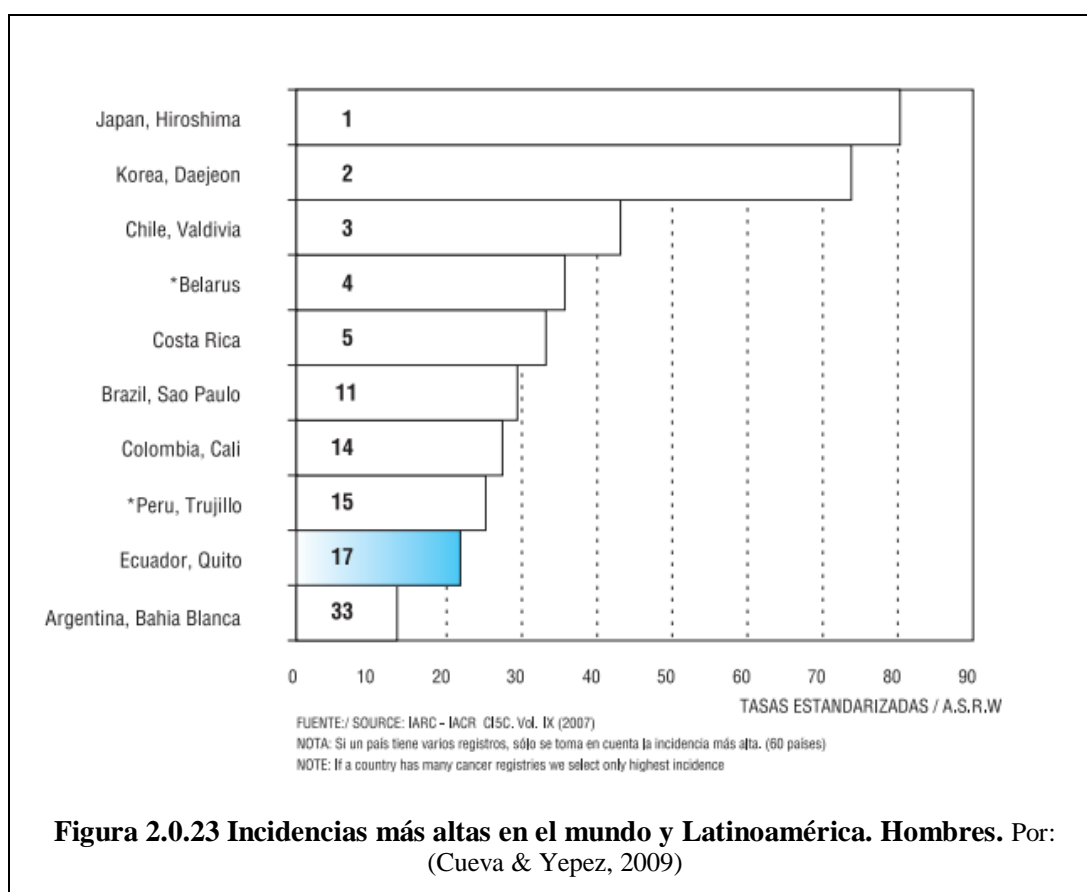
2.6.5 Epidemiología del cáncer gástrico. El cáncer gástrico según la Organización Mundial de la Salud es una de los neoplasmas más frecuentes en el mundo, este tipo de cáncer constituye la segunda causa de muerte en el hombre y la tercera en las mujeres. (Piñol, 1998)

En Estados Unidos, las estadísticas de la incidencia de cáncer gástrico indican que existen 22.800 nuevos casos por año, con una mortalidad anual de 14.700 pacientes, por lo que esta patología representa un gran interés a nivel oncológico (Flores-Cabral, Vojvodic, D., & E, 2004), de igual manera Costa Rica es uno de los países con la tasa más alta de cáncer gástrico, el Ecuador según el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC), en el 2010 se produjeron 9529 defunciones en total, de ellas el 16.45% (1567) corresponden al cáncer de estómago, según causas de Mortalidad relacionadas con el cáncer, a nivel nacional.

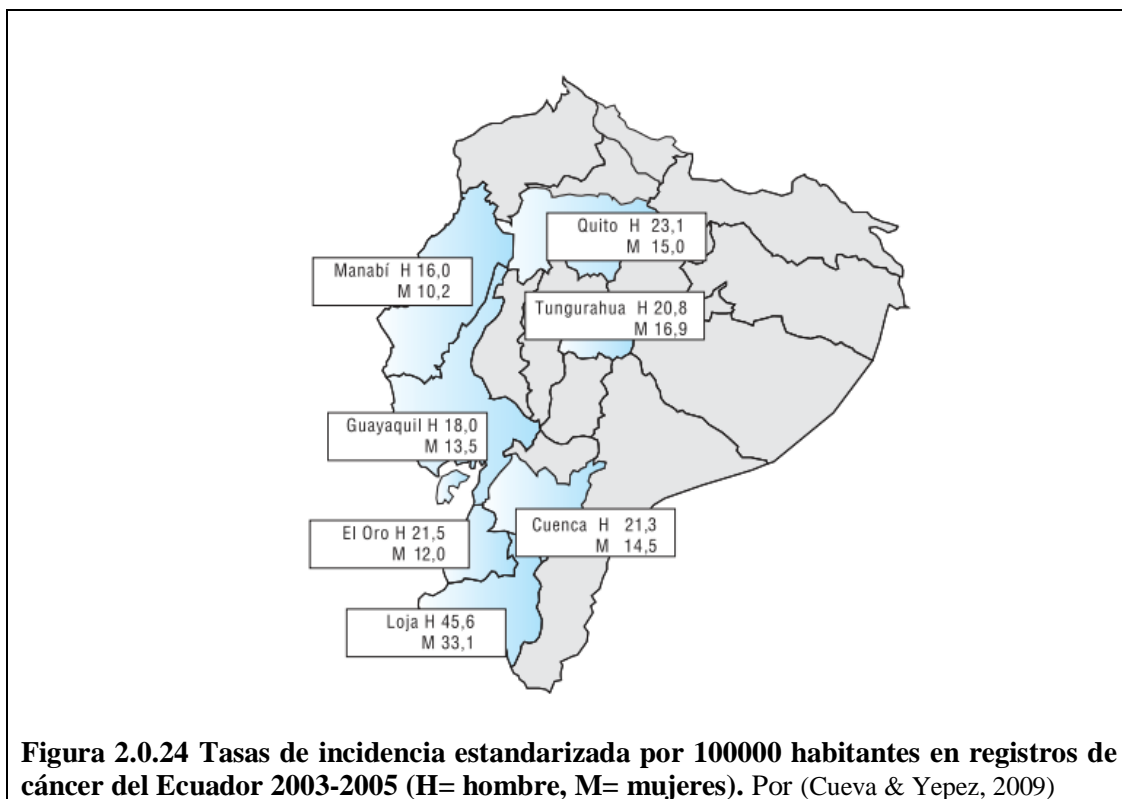
De la población las personas mayores de 40 años presentan una mayor incidencia de la enfermedad con una tasa de mortalidad 8,6 x 100.000 habitantes, en pacientes con una edad mayor a los 60

años, la relación es de 65% de presencia de cáncer gástrico en hombres y en mujeres es del 35%. (Cueva & Yepez, 2009)

La incidencia del cáncer gástrico en hombres sigue siendo alta, incluso en países como Japón y Korea como indica la figura 2.23, esta enfermedad se presenta en la mayoría de países sudamericanos, así como Costa Rica en Centro América, mientras que el Ecuador se encuentra en el puesto número 17 de los países con las tasas más altas, razón por la cual se considera que el cáncer gástrico es el segundo cáncer en frecuencia a nivel mundial.



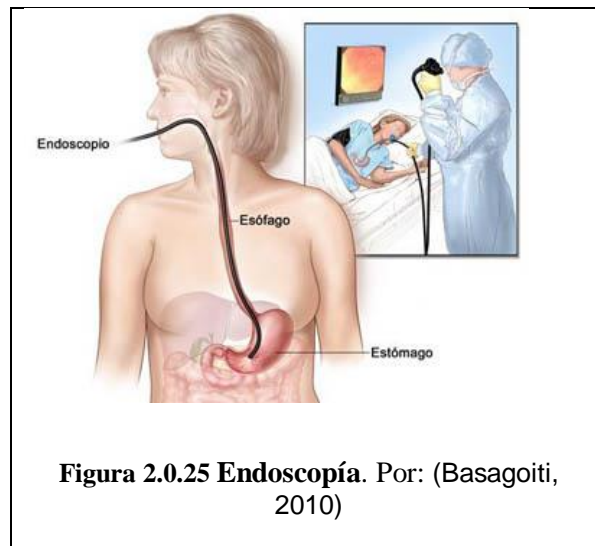
En el Ecuador un análisis por provincias realizado en el período 2003-2005, se encontraron grandes diferencias en la incidencia del cáncer gástrico tanto en hombres como en mujeres, en especial en la provincia de Loja ya que presenta una alta tasa de incidencia, mientras que Manabí es la provincia con la tasa más baja, en el resto de provincias la tasa de incidencia se mantiene constante o se incrementa como en la provincia de Pichincha. (Figura 2.24)



2.6.1 Diagnóstico del cáncer gástrico. El diagnóstico del cáncer de estómago a menudo se retrasa debido a que no siempre se presentan síntomas en las etapas tempranas de la enfermedad y a que los pacientes acuden a la automedicación por trastornos gastrointestinales menos serios como distensión, gases, acidez gástrica y sensación de llenura.

- **Diagnóstico clínico.** Para el diagnóstico clínico se debe conocer los antecedentes familiares de cáncer gástrico y de enfermedades gástricas o de lesiones pre malignas. (Escobar, 2006)
- **Diagnóstico radiológico:** Este tipo de diagnóstico sólo logra detectar, formas de cáncer avanzado o relativamente avanzado, con ayuda del método de doble contraste, se puede observar las lesiones más pequeñas y que podrían ser un carcinoma gástrico precoz. (Escobar, 2006)
- **Diagnóstico endoscópico:** El diagnóstico endoscópico es un tipo de análisis muy confiable, la endoscopia consiste en la introducción de una cámara o lente dentro de un tubo o endoscopio a

través de la boca hasta llegar al estómago que sirve para la visualización de posibles lesiones. (Figura 2.25). (Escobar, 2006)



Diversas situaciones como hemorragia digestiva alta y el control de lesiones benignas pueden llevar a la indicación de endoscopia a un paciente, en la tabla 2.2 podemos determinar los rasgos endoscópicos para estos dos tipos de lesiones.

Tabla 2.2. Rasgos endoscópicos diferenciales entre las lesiones ulceradas benignas y malignas

Características	Úlcera benigna	Úlcera maligna
Forma	Regular	Irregular
Contornos	Nítidos	Mal delimitados
Fondo	No necrótico	Necrótico
Pliegues	Confluentes	No confluentes
Consistencia	Conservada	Friable
Mucosa Vecina	Conservada	Alteración del patrón
Gastritis atrófica	Infrecuente	mucoso
Hemorragia	Por el fondo	Rigidez Frecuente, Por los bordes

Nota: (Molina, 2002)

Un análisis adicional para diagnosticar el cáncer gástrico además de la endoscopia es la biopsia que es obligatoria ante toda lesión gástrica, con independencia de su aspecto endoscópico. La precisión de la biopsia en el cáncer gástrico es muy alta, entre el 90% y el 98% (tabla 2.3).

Tabla 2.3 Diagnóstico del cáncer gástrico

	%
- Radiología con doble contraste y compresión.....	37
- Endoscopia.....	61,3
- Radiología más endoscopia.....	86
- Radiología más endoscopia más biopsia.....	98

Nota: (Molina, 2002)

2.6.2 Morfología y clasificación del cáncer gástrico. Los tumores malignos del estómago que se presentan en mayor frecuencia son: los adenocarcinomas, carcinomas, linfomas, leiomiomas y carcinoides.

El adenocarcinoma es un tumor maligno de epitelio glandular que contiene estructuras tubulares, acinosas o papilares, este ha sido clasificado de muchas maneras: De acuerdo al estadiaje en temprano y avanzado. El temprano según Gutmann desde el punto de vista macroscópico se clasifica en estadio 0, estadio 1, estadio 2, estadio 3, estadio 4 y al cáncer avanzado, que por costumbre se le ha denominado como Borrmann: I, II, III y IV. Por otro lado según Lauren la clasificación histológica comprende el cáncer de tipo intestinal, el difuso y el indiferenciado no productor de moco, mientras que la clasificación según Mulligan es: cáncer de glándulas pilóricas y cáncer de tipo intestinal, por un lado y cáncer de células de tipo gástrico por otro. (Espejo Romero & Navarrete Siancas, 2003)

Según la OMS los clasifica en: Papilar, tubular (tub1, tub2 y tub3), en células en anillo de sello, indiferenciado propiamente y mucinoso. (Espejo Romero & Navarrete Siancas, 2003)

De lo anteriormente expuesto las principales clasificaciones son:

Clasificación de gutmann

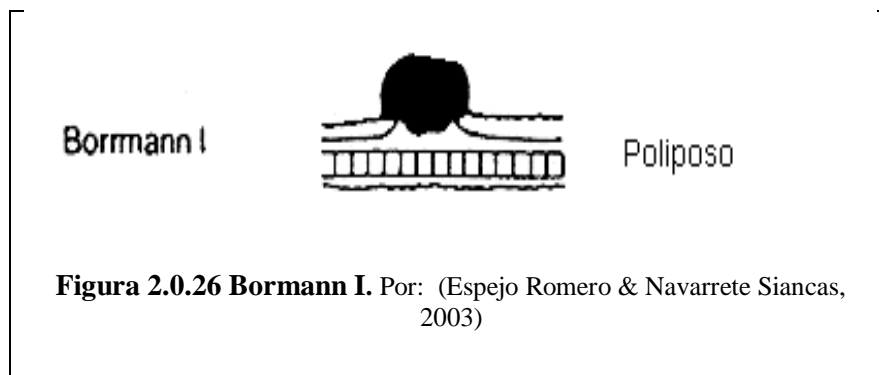
- **Estadio 0:** cáncer "in situ" (intraepitelial). El tumor se localiza sólo en la capa más interna del estómago llamada mucosa. Los tumores se los encuentran por casualidad, cuando el paciente se hace una endoscopia por otro motivo.

- **Estadio 1:** cáncer intramucoso, el tumor afecta a la totalidad del grosor de la capa mucosa.
- **Estadio 2:** infiltración de la submucosa, afecta a la mucosa y a los ganglios linfáticos cercanos al estómago. También son de este estadio los que afectan a las tres capas del estómago (mucosa, muscular y serosa), aunque no haya ganglios invadidos por el cáncer.
- **Estadio 3:** afectación de toda la pared hasta la serosa, el cáncer afecta a varias capas del estómago y a los ganglios linfáticos.
- **Estadio 4:** difusión metastásica, el cáncer afecta a más de 15 ganglios o bien se ha extendido a órganos cercanos y lejanos al estómago (huesos, pulmón...).

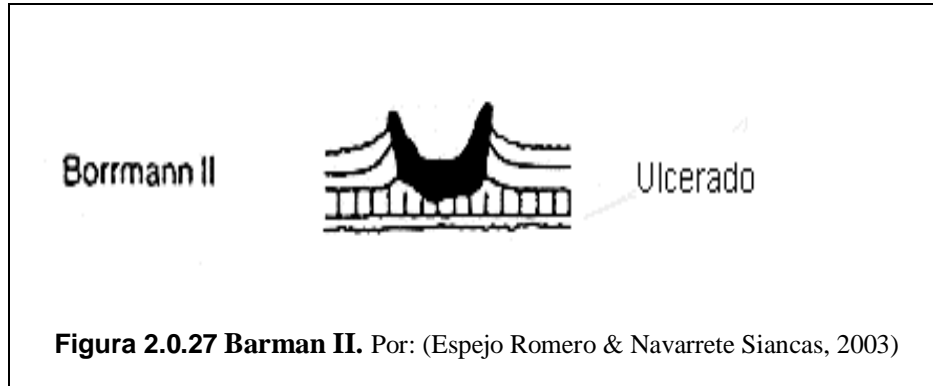
Clasificación de borrmann

Esta clasificación se emplea exclusivamente para el cáncer avanzado que excede los 3-4 cm de tamaño.

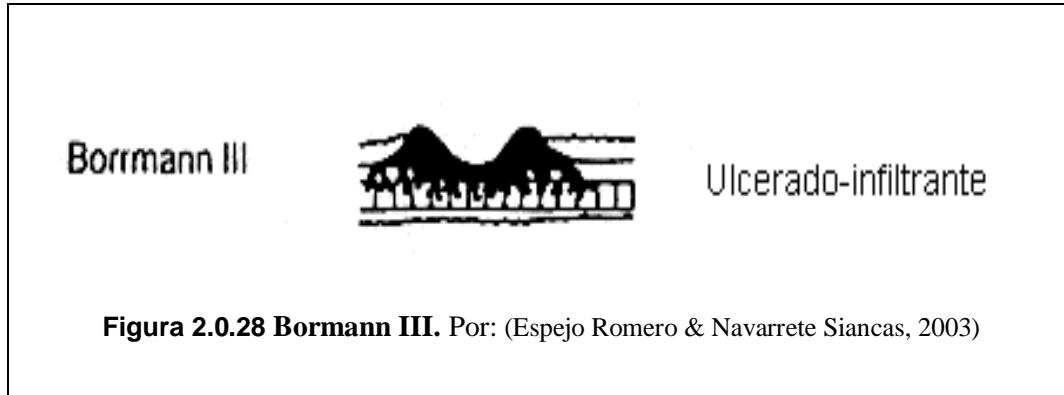
- **Tipo I o polipiode** (figura 2.26): Este tipo de cáncer es el menos frecuente y se presenta como tumores circunscritos, solitarios y sin ulceración, de localización preferentemente en fundus o curvatura mayor. (Escobar, 2006)



- **Tipo II o ulcerado** (figura 2.27): Es la forma más frecuente de cáncer, es un tipo de tumor con elevación marginal de tipo parietal y con contornos bien definidos, además son poco infiltrantes, de crecimiento lento y metástasis tardías. (Escobar, 2006)



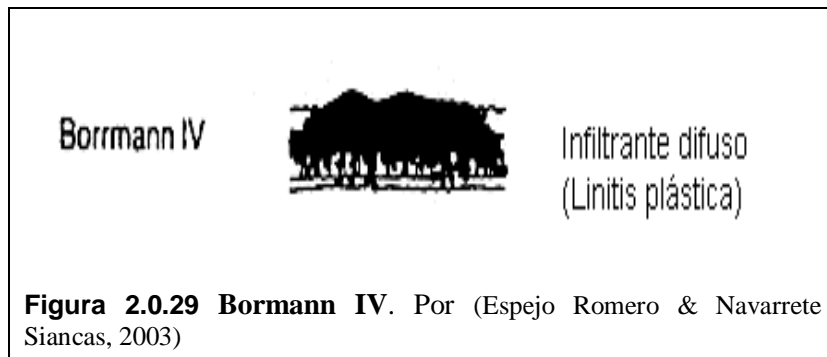
- **Tipo III o crateriforme** (figura 2.28): este tipo corresponde a cánceres ulcerados; en parte con elevación marginal y diseminación difusa parcial, se localizan con frecuencia en antro y curvatura menor del estómago. (Escobar, 2006)



- **Tipo IV o difuso** (figura 2.29): Son tumores de gran crecimiento por la capa submucosa y serosa, ocasiona linitis plástica (pérdida de la elasticidad de la pared gástrica) o aspecto de bota de cuero. (Escobar, 2006).

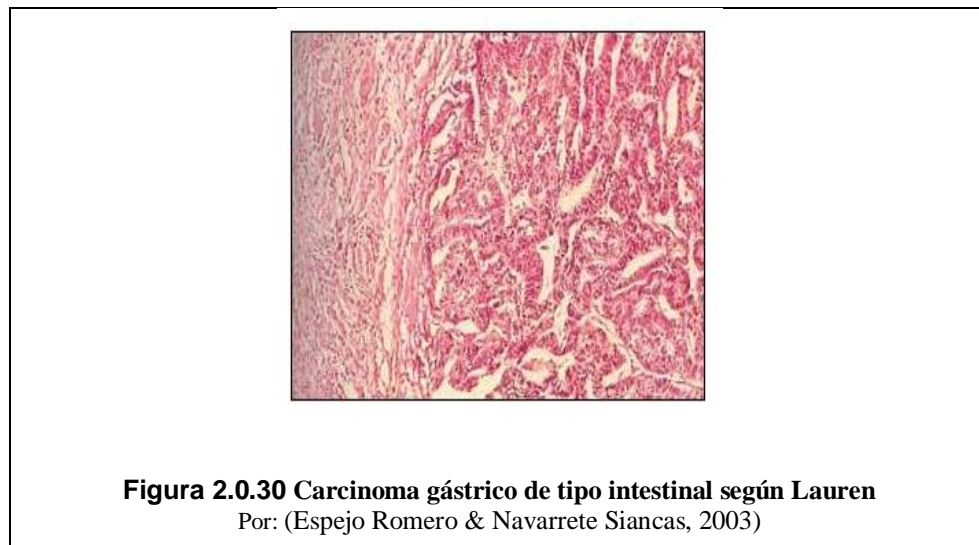
Se distinguen dos tipos:

- *Escirro*: crecimiento infiltrante muy rico en tejido conectivo. (Escobar, 2006)
- *Linitis plástica de Brinton*: es el tumor más maligno. (Escobar, 2006)



Clasificación histológica de lauren

- **Intestinal o enteroide** (figura 2.30): aparecen células cilíndricas semejantes a las intestinales, con borde en cepillo más o menos definido y con la presencia de elementos caliciformes.



- **Difuso** (figura 2.31): puede presentar en su superficie algunas estructuras glandulares, aunque su principal característica es la presencia de células redondeadas pequeñas, aisladas, que infiltran de forma extensa y difusa la pared gástrica.

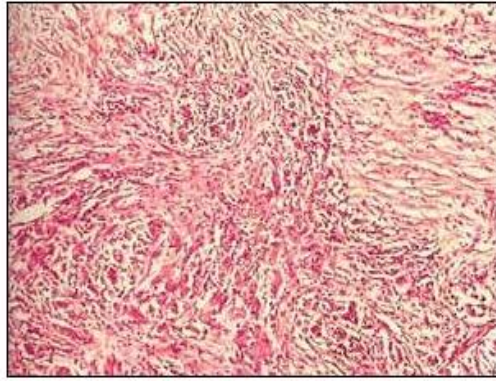


Figura 2.0.31 Carcinoma gástrico de tipo difuso según Lauren
Por: (Espejo Romero & Navarrete Siancas, 2003)

2.6.3 Patogenia del cáncer gástrico. El cáncer gástrico se desarrolla a través de uno o varios procesos en el cual un trastorno genético, heredado o adquirido, es activado por varios factores que actúan a lo largo de un periodo de tiempo, la acumulación de trastornos genéticos determina la aparición de lesiones precancerosas y de cáncer. (Nuñez, Peña, Montiel, Villalva, Pazos, & Diaz, 2011)

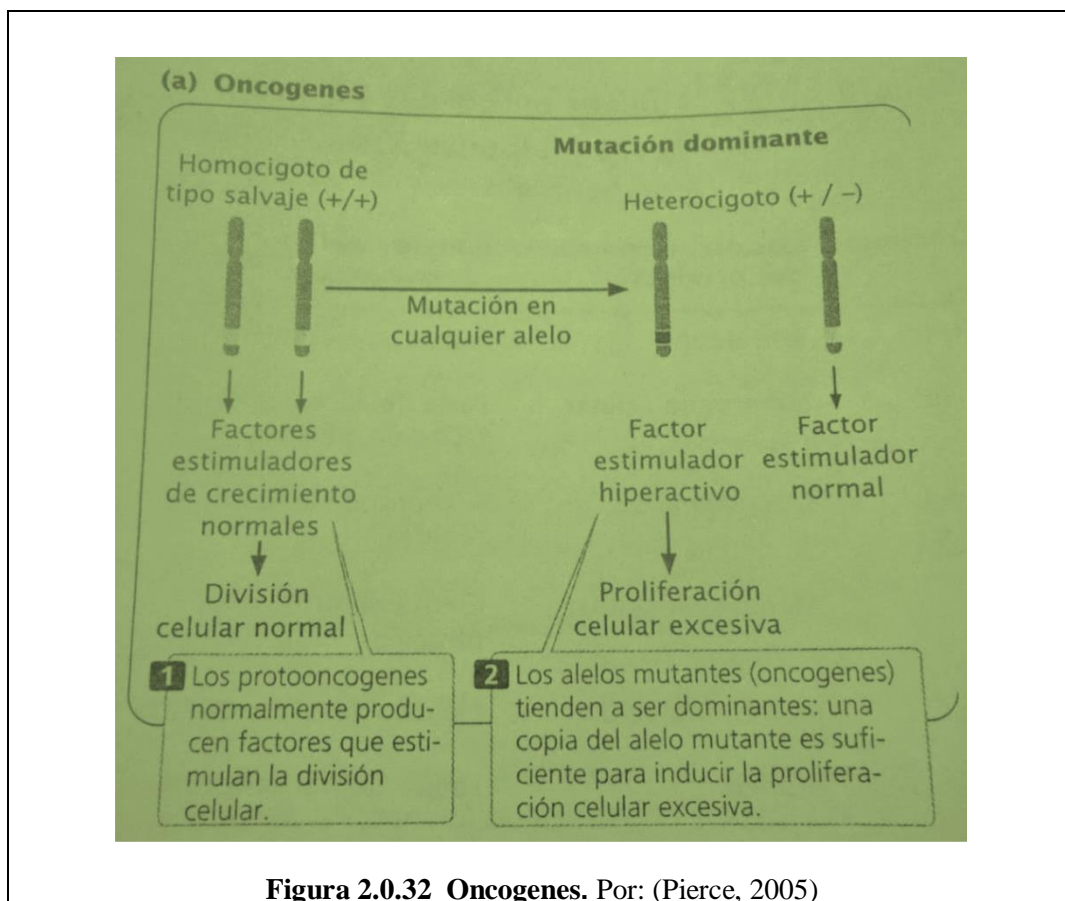
La probabilidad de ocurrencia de mutaciones o alteraciones genéticas puede aumentar muchas veces cuando una persona se expone a ciertos factores como son:

- **Químicos:** Los carcinógenos químicos, son compuestos electrófilos que se unen a los sitios ricos en electrones de los ácidos nucleicos del ADN. (Sanchez, 2012)
- **Biológicos:** Se relaciona las infecciones virales causan cáncer por mutaciones directas del ADN o insertando material genético en la célula, que produce mutación. (Sanchez, 2012)
- **Físicos:** los factores físicos pueden causar daño de dos formas: 1) la energía radiante daña directamente las moléculas de ADN, o 2) la energía transmitida hace que las moléculas pierdan

electrones y se tornen electrófilas actuando como carcinógenos químicos. Entre los factores físicos tenemos los rayos x, rayos gamma y partículas provenientes de sustancias radioactivas e incluso la luz ultravioleta. (Sanchez, 2012)

Las posibles alteraciones en el genoma que se presentan son mayor actividad de la enzima telomerasa, anormalidad de genes llamados oncogenes, genes supresores, genes reparadores del DNA, reguladores del ciclo celular y moléculas de adhesión. (Nuñez, Peña, Montiel, Villalva, Pazos, & Diaz, 2011)

El cáncer puede surgir de mutaciones en cualquier momento de la división celular, activándose genes en momentos inadecuados de forma análoga, estas mutaciones son normalmente dominantes ya que una mutación en una sola copia del gen es suficiente para producir un efecto estimulador, los genes estimuladores dominantes que causan actividad excesiva en las células tumorales son los denominados **oncogenes**. (Pierce, 2005)



La división celular también puede ser estimulada cuando los genes inhibidores se inactivan, la mutación de estos genes tienen efectos recesivos ya que ambas copias deben mutar para eliminar toda la inhibición, es decir, pierden la función completamente, estos genes se denominan **genes supresores de tumores**. (Pierce, 2005)

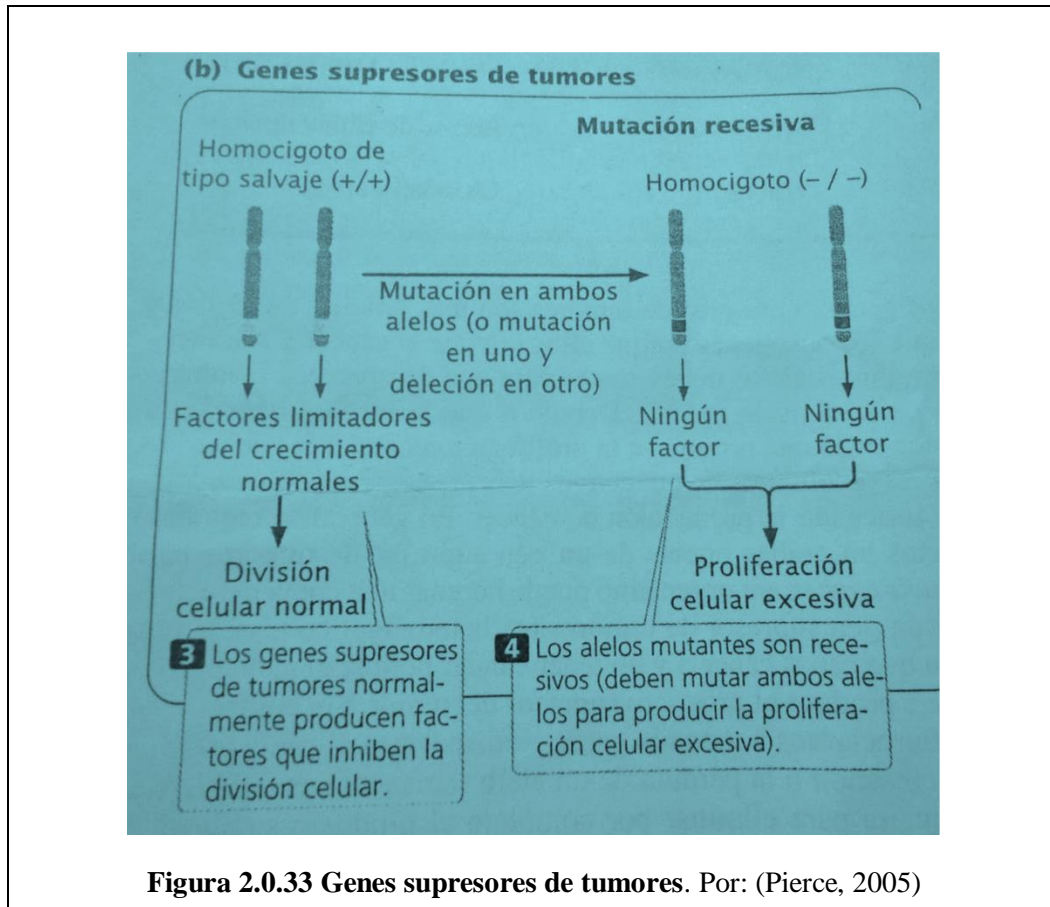


Figura 2.0.33 Genes supresores de tumores. Por: (Pierce, 2005)

Los protooncogenes son una familia de genes normales que codifican proteínas, pero cuando mutan se transforman en oncogenes que contribuyen al desarrollo del cáncer. (Pierce, 2005)

En tanto que los **genes que reparan el ADN** no contribuyen directamente al crecimiento ni a la proliferación de las células, intervienen indirectamente, corrigiendo los errores que se producen espontáneamente en el ADN durante la división celular, o errores que son consecuencia de la exposición a productos químicos mutágenos o a la radiación, cuando los errores del acoplamiento del ADN se acumulan en los protooncogenes y en los genes supresores del cáncer, terminan por aparecer carcinomas (Díaz Rubio & García Conde, 2000)

Genes implicados en el cáncer gástrico. Existen evidencias para considerar que la activación de los oncogenes y el silenciamiento de los genes supresores de tumores, son dos eventos con equitativa responsabilidad en la oncogénesis por lo que se ha sugerido la existencia de un efecto cooperativo entre estas dos familias de genes, sea encontrado en fases que preceden al desarrollo de la neoplasia una alteración de un oncogén c-met (en cromosoma 7q31), es el primer oncogén conocido que interviene en el proceso neoplásico inhibiendo la apoptosis, la pérdida de este gen se encuentra en el 50% de los cánceres bien diferenciados, además que la pérdida o mutación del gen oncosupresor p53 (cromosoma 17p) se encuentra en el 50% de los cánceres gástricos, en el 30% de los adenomas y 10% de las metaplasias intestinales, mientras que el 30% de los cánceres gástricos escasamente diferenciados presenta niveles aumentados de bcl-2 (cromosoma 18q20).

Como ya se indicó los oncogenes, junto con los genes supresores tumorales, contribuyen al desarrollo de células tumorales una vez que han sido alterados sus mecanismos de control por cambios estructurales o regulatorios específicos. Al estar involucrado un mismo oncogén en muchos escenarios tumorales enfatiza en la unidad de la biología del cáncer. La variedad de los cambios estructurales y regulatorios, tales como las mutaciones, las translocaciones, la inserción retroviral y la amplificación, que pueden activar a un mismo oncogén en diferentes tumores, muestra una conexión directa entre genes activados y el fenotipo neoplásico, independientemente de los mecanismos de activación. (Nuñez, Peña, Montiel, Villalva, Pazos, & Diaz, 2011)

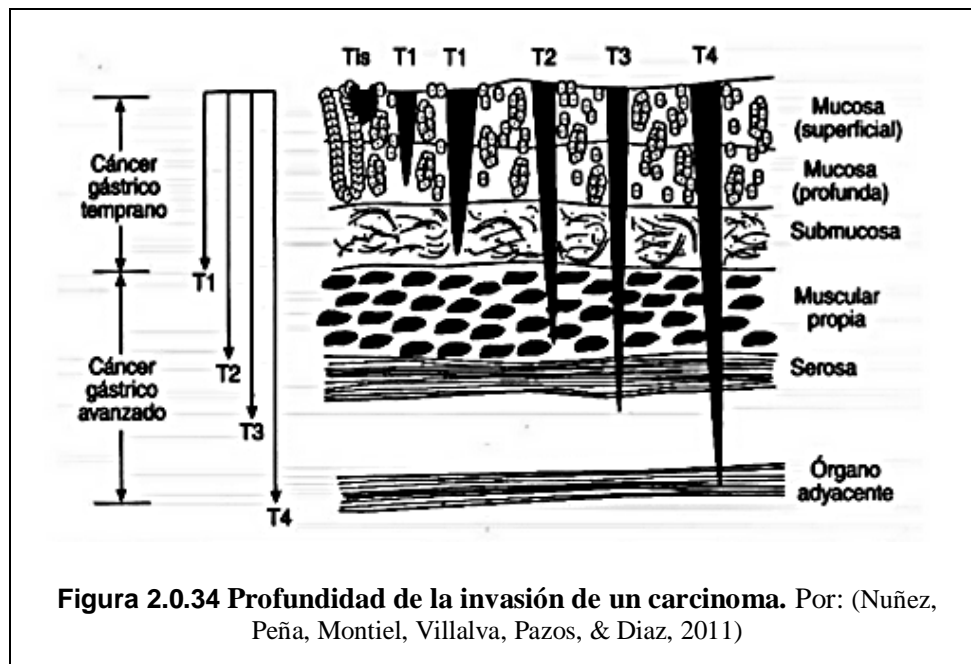
2.6.4 Etapas del cáncer gástrico. El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento autónomo de células anormales, es el resultado de una pérdida de la regulación de los aspectos críticos de la función celular, como proliferación, diferenciación y apoptosis. Sin la restricción apropiada de estos procesos, las células neoplásicas se producen en gran número, invaden estructuras adyacentes y desarrollan colonias metastásicas. El desarrollo de estas características anormales ocurre de manera progresiva.

- **Inicio:** es la exposición a agentes que inducen mutaciones decisivas para la unión de metabolitos carcinógenos electrofílicos al DNA, es decir, un cambio genético hereditario.
- **Promoción:** es la exposición de las células iniciadas a agentes que inducen su proliferación, permitiendo mutaciones espontáneas.

- **Progresión:** es el desarrollo continuo de un crecimiento y metástasis de las células mutadas. El crecimiento del tejido dañado altera los mecanismos homeostáticos y se especifica por:
 - Falta de respuesta a los reguladores del crecimiento normal.
 - Fenotipo invasivo
 - Evasión de la destrucción del tumor mediada por el sistema inmunológico.

La primera alteración visible de cambio neoplásico es la displasia, es un estado en que las células epiteliales muestran cambios de tamaño, forma y organización, el grado de desviación de la estructura normal de las células y tejidos definen la displasia como leve, moderada o severa.

La displasia grave se asocia con el crecimiento de carcinoma, la característica más notable de este es la capacidad de invadir la membrana basal y propagarse sin considerar los límites de tejido normal (figura 2.34).



La profundidad de la penetración tumoral tiene una relación directa con la incidencia de invasión ganglionar linfática.

El sitio más frecuente de metástasis es el hígado, seguido por los pulmones, sino hay un tratamiento previo el período de vida es 12 meses.

Etapas del cáncer (figura 2.35):

- **Etapa 0:** es un cáncer en su ciclo inicial, este se halla en la capa más interna de la pared estomacal.
- **Etapa 1:** el cáncer se encuentra en la segunda o tercera capa de la pared estomacal, no se ha dispersado a ganglios linfáticos cercanos, (los ganglios linfáticos son estructuras pequeñas que se encuentran en todo el cuerpo y su función es producir y almacenar células que combaten la infección).
- **Etapa II:** se puede presentar el cáncer en la segunda, tercera, o en las cuatro capas de la pared estomacal con o sin diseminación a ganglios linfáticos y órganos cercanos al tumor.
- **Etapa III:** el cáncer se encuentra en la tercera capa o en las cuatro capas de la pared estomacal y se ha diseminado a los ganglios linfáticos y tejidos cercanos.
- **Etapa IV:** el cáncer se encuentra en las 4 capas y diseminado a los ganglios linfáticos y tejidos lejanos del tumor.

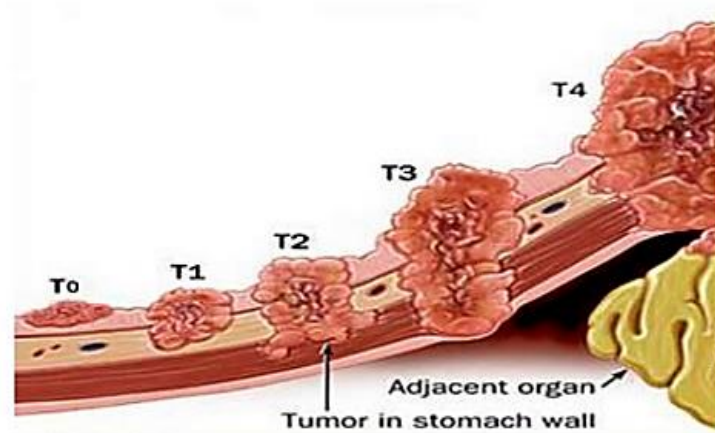


Figura 2.0.35 Diseminación del carcinoma a través de las capas del estómago y sus etapas.

Por: (Nuñez, Peña, Montiel, Villalva, Pazos, & Diaz, 2011)

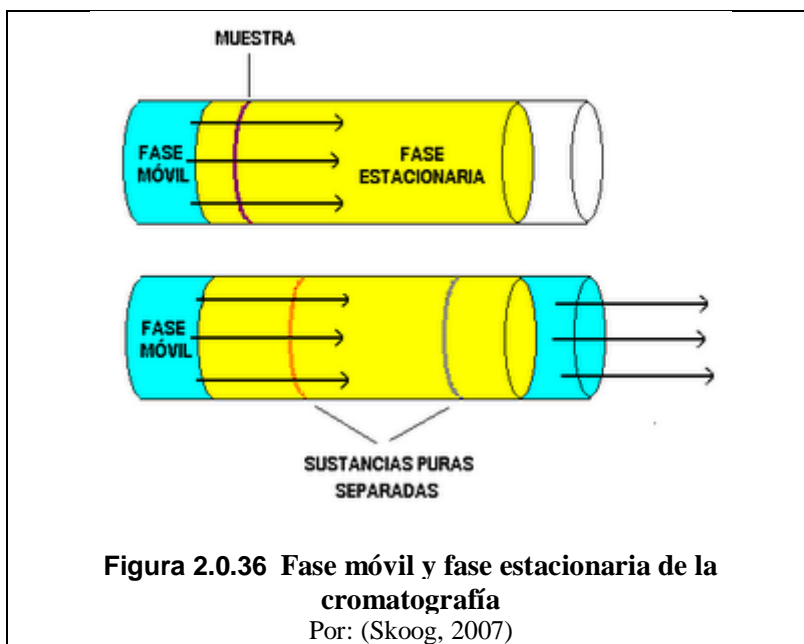
2.7 Cromatografía- definiciones

La cromatografía es un método físico de separación, identificación y determinación de los componentes químicos en mezclas complejas. (Skoog, 2007)

Recientemente la I.U.P.A.C define la cromatografía como, un método usado principalmente para la separación de una muestra, en el cual los componentes son distribuidos entre dos fases, una que se encuentra en reposo llamada Fase Estacionaria, mientras que la otra llamada fase móvil se mueve en una dirección definida. (Morante, Sierra, & Del Hierro, 2007)

La **fase móvil** consiste en un fluido sea este un gas, un líquido o un fluido supercrítico, que arrastra a la muestra a través de una **fase estacionaria** que se trata de un sólido o un líquido fijado en un sólido (figura 2.36).

Los componentes de la muestra interaccionan en forma diferente y logran atravesar la fase estacionaria a distintas velocidades para su separación, se pueden aislar moléculas en función de sus cargas, tamaños y masas moleculares.

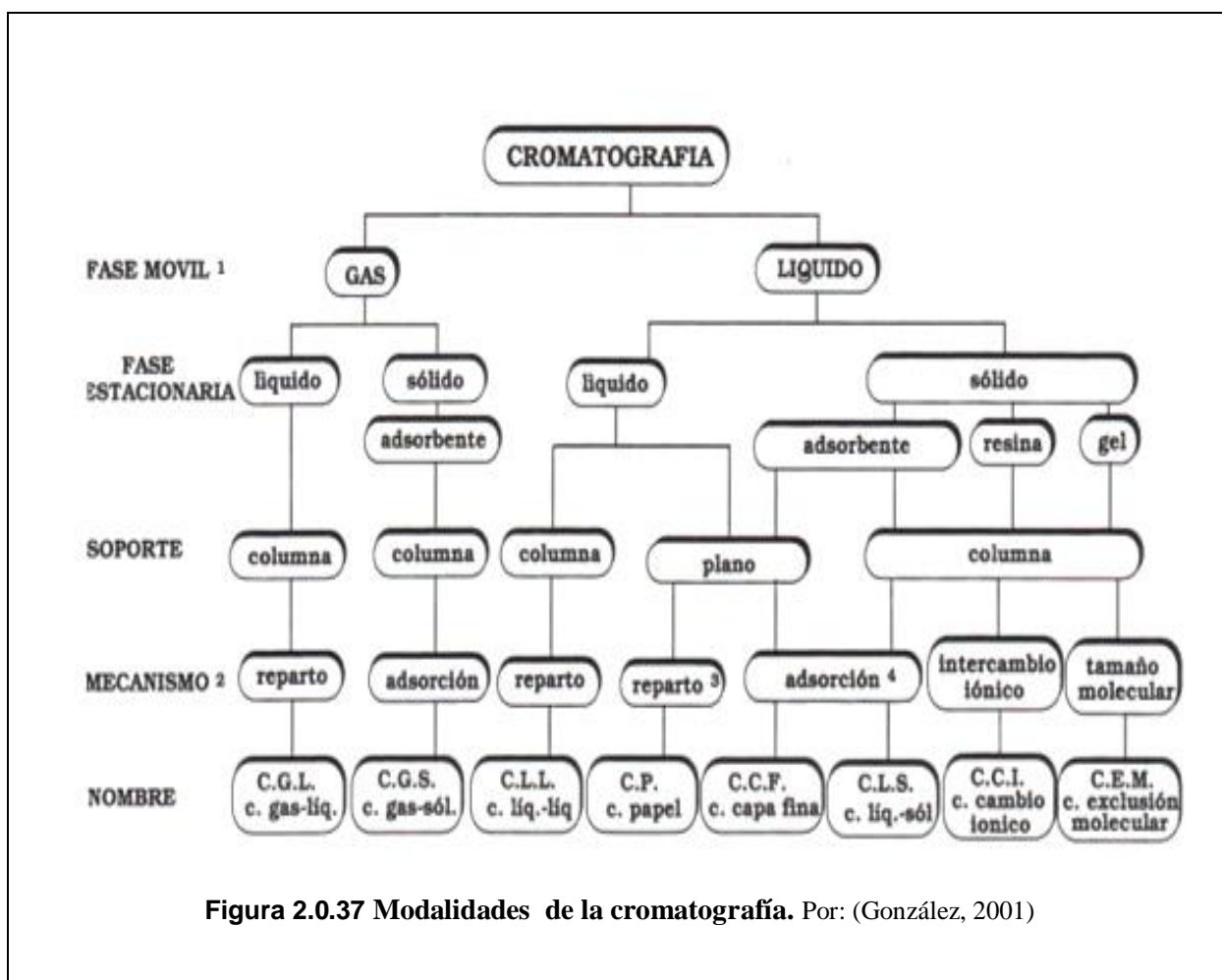


La cromatografía permite identificar y cuantificar una muestra, la identificación se basa en la medida de parámetros cromatográficos como tiempos y volúmenes de retención, mientras que el análisis cuantitativo se basa en la medida de alturas o áreas de picos cromatográficos que se relacionan con la concentración, teniendo siempre un resultado grafico llamado cromatograma. (Skoog, 2007). Cada

uno de los picos que se muestran en el cromatograma constituye un componente químico que es identificable por su tiempo de retención, correspondiente al tiempo necesario para que el componente eluya, es decir, para que llegue hasta el detector del equipo.

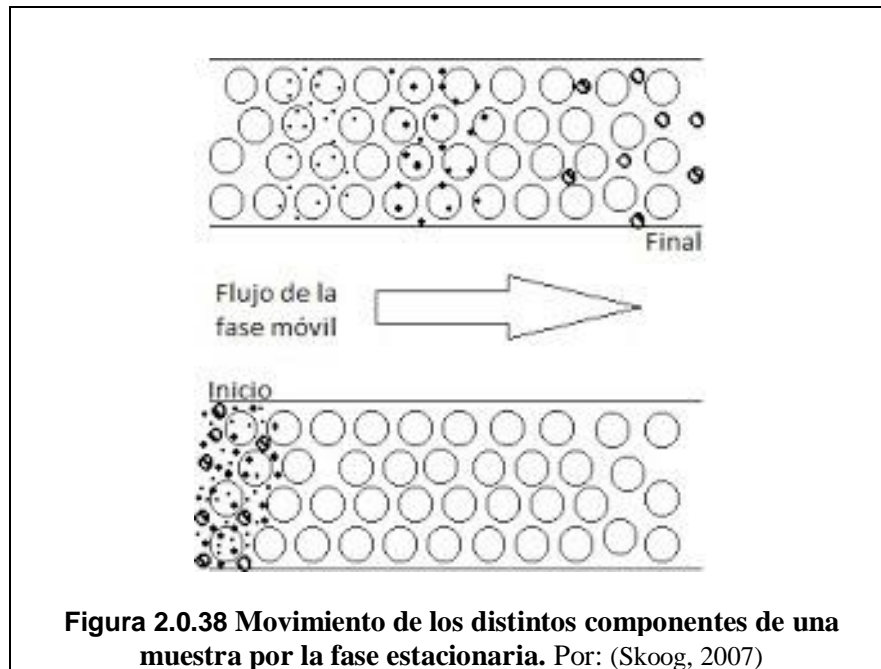
2.7.1 Modalidades de la Cromatografía. Las diferentes modalidades de la cromatografía están determinadas por varios factores como el estado físico de las fases móvil y estacionaria (gas-líquido, líquido-líquido), el soporte utilizado (columna, papel), el mecanismo de la separación (adsorción, reparto), e incluso el tipo de soluto (cromatografía iónica, cromatografía de proteínas, etc.).

En el cuadro de la figura 2.37 se muestra una clasificación en función de algunos parámetros mencionados anteriormente.



Algunos términos empleados en cromatografía:

- **Elución:** Es el procedimiento en el que la fase móvil pasa de forma continua a través o a lo largo del lecho cromatográfico y la muestra se suministra al sistema de forma discreta, como una pequeña cantidad en un tiempo breve, como indica la figura 2.38.



- **Efluente:** se denomina a la fase móvil que atraviesa la columna. (Skoog, 2007)
- **Serie eluotrópica:** es una lista de disolventes clasificados según su poder de dilución. (Skoog, 2007)
- **Tiempo de Retención:** Es el tiempo transcurrido entre el instante en que se introduce la mezcla y el instante en que se detecta la señal propia del componente en su máxima intensidad. (Skoog, 2007)

2.7.2 Cromatografía-HPLC. La cromatografía es una técnica de separación, con el objeto de aumentar la eficiencia en las separaciones, el tamaño de las partículas de fase fija se fue disminuyendo hasta el tamaño de los micrones, lo cual generó la necesidad de utilizar altas presiones para lograr que fluya la fase móvil. De esta manera, nació la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). (Quattrocchi, Abelaira, & Laba, 2002)

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, del inglés High Performance Liquid Chromatography), es la técnica cromatográfica más empleada en la actualidad, en la que la fase estacionaria tiene carácter no polar, y la fase móvil posee carácter polar (generalmente agua o mezclas con elevada proporción de la misma, o de otros disolventes polares, como por ejemplo metanol). (Quattrocchi, Abelaira, & Laba, 2002)

La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que recorre por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. (Quattrocchi, Abelaira, & Laba, 2002)

Las separaciones por HPLC son realizadas normalmente a temperatura ambiente, incluso sustancias termolábiles van a pasar por el sistema cromatográfico sin que ocurra degradación.

Cabe destacar que el equipo de HPLC separa con gran eficacia, identifica los compuestos separados por la columna y además lo cuantifica por su altura o área de picos en el cromatograma.

Componentes básicos en un equipo de HPLC (figura 2.39):

- Sistema de suministro
- Inyector
- Columna
- Detector
- Registrador
- Bomba
- Conducciones de la fase móvil

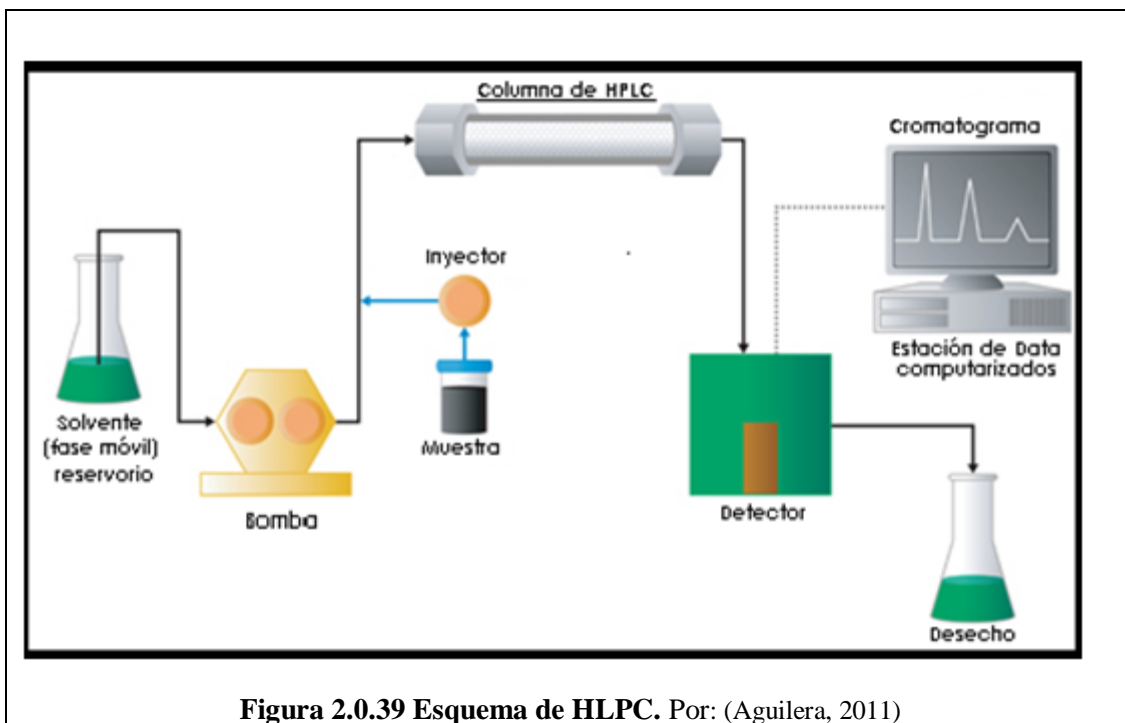


Figura 2.0.39 Esquema de HPLC. Por: (Aguilera, 2011)

- **Sistema suministro de la fase móvil:**

Se trata de reservorios para los disolventes, se utiliza para degasificar y eliminar partículas en suspensión de los disolventes que interfieren formando burbujas en los sistemas de detección. (Quattrocchi, Abelaira, & Laba, 2002)

- **Sistema de bombeo de la fase móvil:**

Las bombas de HPLC impulsan la fase móvil proveniente del reservorio de solvente hacia el inyector, y desde allí hacia la columna.

Son bombas para impulsar a la fase móvil, deben vencer altas presiones, proporcionar caudales estables entre 0.1-10ml/min, deben ser construidas con materiales resistentes a la presión y agresiones químicas y ser de fácil manejo.

Se utilizan tres tipos de bombas: bombas recíprocas, bombas de desplazamiento, las más utilizadas y bombas neumáticas.

- **Inyectores:**

Son los encargados de introducir la muestra en la cabeza de la columna de forma adecuada.

Hay dos tipos de inyectores:

Septum: Inyecta la muestra mediante una jeringa. Se usa poco y no permite mucha presión.

Bucle de muestreo: Este dispositivo normalmente se encuentra integrado en el equipo cromatográfico y existen bucles intercambiables que permiten la elección de tamaños de muestra.

Los inyectores automáticos deben contener, además de una válvula de inyección y de un mecanismo que permite su llenado, un dispositivo para colocar las muestras a inyectar, en general un carrusel que aloja viales donde se coloca las muestras.

Las válvulas se accionan con motores eléctricos o por medios neumáticos ya sea empleando aire comprimido, nitrógeno o helio. Algunos equipos permiten controlar el avance y el retroceso del carrusel. De esta manera es posible que el vial conteniendo la solución estándar sea inyectada al principio del análisis e intercalarse tantas veces como sea necesario entre las soluciones muestra teniendo como finalidad un control de la precisión o la calibración del equipo. (Quattrocchi, Abelaira, & Laba, 2002)

- **Precolumnas:**

Se colocan delante de la columna para eliminar suspensiones, la composición del relleno debe ser semejante al de la columna.

- **Columna:**

La mayoría de las columnas de cromatografía de líquidos tienen una longitud entre 10 y 30 cm, fabricada de acero inoxidable y con un diámetro interno uniforme aproximadamente de 4 a 10 mm.

La columna más utilizada es la de 25 cm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno, empaquetada con partículas de 5 μm .

Recientemente se ha fabricado columnas de alta resolución más rápidas, las cuales tienen menores dimensiones, estas columnas pueden tener diámetros internos que oscilan entre 1 y 4,6 mm y se rellenan con partículas de 3 o 5 μm , presentan una ventaja de rapidez y del mínimo consumo de

disolvente característica muy importante ya que los disolventes de alta pureza que se requieren en cromatografía de líquidos son muy costosos. (Skoog, 2007)

- **Detectores:**

Los detectores en HPLC no son tan universalmente aplicables, ni tampoco tan fiables, pero presentan cualidades como adecuada sensibilidad (10-15 g de analito), buena estabilidad y reproducibilidad, además un tiempo de respuesta corto.

Los detectores más comunes empleados en HPLC (Skoog, 2007):

- Absorbancia
- Fluorecencia
- Electroquímico
- Índice de refracción
- Conductividad
- Espectrometría de masas

Los detectores pueden clasificarse en generales y selectivos. Los detectores generales miden el cambio de alguna propiedad física de la fase móvil que contiene el analito en comparación con la misma fase móvil pura. Ejemplos típicos son el detector de índice de refracción y el de conductividad.

Los detectores selectivos son aquellos sensibles a alguna propiedad propia del soluto, por ejemplo el detector UV, que producirá una señal proporcional a la absorbancia del soluto a una longitud de onda dada. (Quattrocchi, Abelaira, & Laba, 2002)

2.7.3 Naturaleza de la fase móvil. Según la naturaleza de la fase móvil, existe cromatografía líquida y cromatografía de gases además de la cromatografía de fluidos supercríticos, según la fase móvil sea un líquido o un gas respectivamente.

En la cromatografía líquida, se encuentra principalmente la cromatografía en capa fina, la cromatografía líquida en columna abierta y la cromatografía líquida de alta performance (HPLC),

sin embargo, todas las modalidades de la cromatografía concuerdan en el mismo criterio de separación.

A diferencia de otros tipos de cromatografía, en la cromatografía de gases la fase móvil no interactúa con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna, en HPLC la fase móvil es el parámetro fundamental que gobierna la separación, debido a que debe cumplir con algunos requisitos como no debe degradar la fase estacionaria, debe disolver la muestra a analizar, ser miscible con otros disolventes si se pretende utilizar mezclas, ser compatible con el detector utilizado, los índices de polaridad de las fases móviles cromatográficas más comunes se detallan en la siguiente tabla 2.4. (Quattrocchi, Abelaira, & Laba, 2002)

Tabla 2.4 Polaridad de solventes

Solvente	Índice de Polaridad
Isooctano	- 0.4
n-Hexano	0.0
Eter Isopropílico	2.2
Tolueno	2.3
Eter Etilico	2.9
Cloruro de Metileno	3.4
n-Butanol	3.9
Isobutanol	3.9
n-Propanol	4.1
Tetrahidrofurano	4.2
Acetato de Etilo	4.3
Isopropanol	4.3
Cloroformo	4.3
Metil Etil Cetona	4.5
Dioxano	4.8
Etanol	5.2
Acetona	5.4
Acetonitrilo	6.2
Metanol	6.6
Formamida	7.3
Agua	9.0

Nota: adaptada de (Quattrocchi, Abelaira, & Laba, 2002)

Se debe tener en cuenta que no todos los solventes son adecuados para trabajar en HPLC, ya que la condición de estado líquido no es suficiente por sí misma para que una sustancia se pueda emplear como fase móvil. Un solvente apropiado para HPLC debe cumplir con algunos requisitos, entre los cuales podemos destacar los siguientes:

- Alto poder solubilizante de las muestras.
- Baja reactividad
- Compatibilidad con el detector utilizado
- Seguridad
- Alto grado de pureza

2.7.4 La Naturaleza de la Fase Estacionaria. Cuando la fase estacionaria es un sólido y la fase móvil un líquido, la cromatografía se denomina cromatografía líquido-sólido (LSC). Semejantemente existirán una cromatografía líquido-líquido (LLC), gas-líquido (GLC) y gas-sólido (GC). (Quattrocchi, Abelaira, & Laba, 2002)

2.7.5 Sistemas de gradientes. Cuando la polaridad de los componentes a separar es muy diferente, se puede optar por dos alternativas: la corrida multidimensional o la utilización de un gradiente de solventes.

El gradiente de solventes en HPLC varía en la composición de la fase móvil, comenzando la elución con un solvente débil y aumentando progresivamente la proporción del componente fuerte, el gradiente de solventes se gradúa por el intervalo de variación, es decir, por la velocidad de cambio de solvente débil a solvente fuerte.

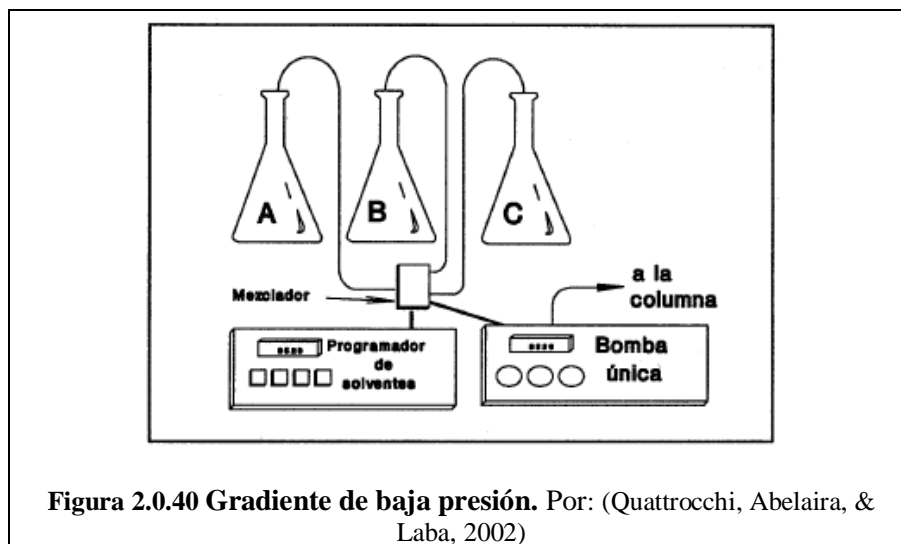
En todos los casos el gradiente debe comenzar con el solvente débil, aumentando gradualmente la fuerza de la fase móvil que recibe la columna.

- **Gradientes de baja presión**

Es uno de los tipos formadores de sistemas de gradientes, se emplea, una bomba y válvulas solenoides que entregan cada solvente en una cámara de mezclado de volumen pequeño (figura 2.40).

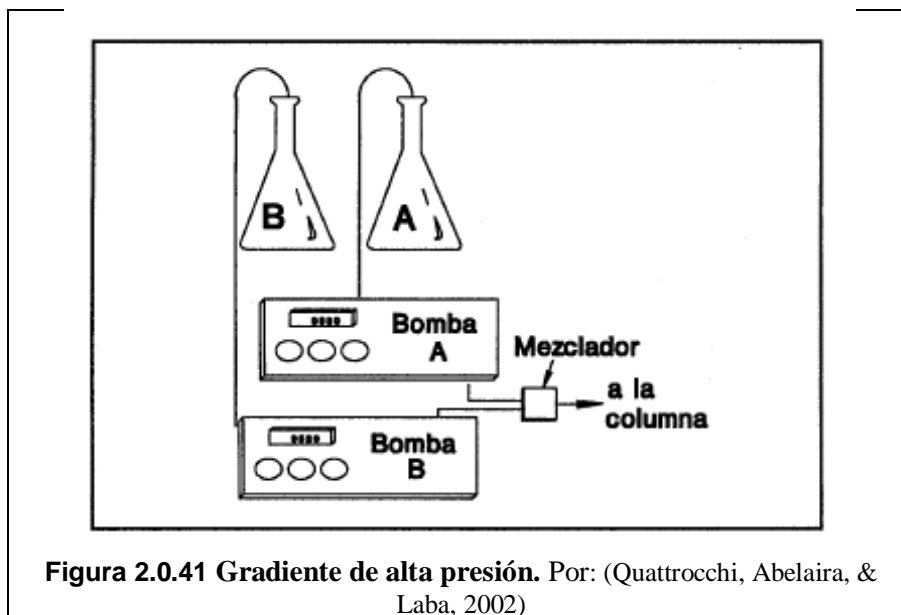
La fase móvil instantánea, es entregada a la bomba. Este sistema permite mezclar de 2 a 4 solventes individuales, regulando el ciclo de apertura de cada válvula individual.

La principal ventaja de este tipo de sistema está dada por el costo y por la precisión lograda en los extremos del gradiente, ya que todo el caudal es entregado por el mismo dispositivo. (Quattrocchi, Abelaira, & Laba, 2002)



- Gradientes de alta presión

Para este tipo de gradiente se utiliza una bomba de alta presión por cada solvente, la cual es comandada por un programador y el solvente entregado se mezcla a alta presión en una cámara de bajo volumen y dirigido hacia el sistema (figura 2.41). (Quattrocchi, Abelaira, & Laba, 2002). Su desventaja es costo, debido a que cada solvente necesita su bomba impulsora.



CAPITULO III

METODOLOGÍA

3.1 Tipo de investigación

Es una investigación que por el análisis y alcance de sus resultados pretende ser bibliográfica y experimental.

3.2 Población y muestra

3.2.1 Población. Ganado vacuno que presenta Hematuria enzoótica bovina, relacionada con la ingesta del *Pteridium arachnoideum* helecho macho como especie invasora, presente en las zonas de pastoreo de Tronador Grande, Provincia de Bolívar.

3.2.2 Muestra. 15 muestras de leche de ganado vacuno que ha ingerido *Pteridium arachnoideum* y que presentan hematuria enzoótica bovina, recolectadas a 3 alturas diferentes (1635 m.s.n.m, 1599 m.s.n.m, 1404 m.s.n.m), es decir, 5 muestras por cada altura.

3.3 Diseño experimental

En las 15 muestras de leche recolectadas a 3 diferentes alturas se procede a la extracción e identificación del Ptaquilósido para luego realizar la cuantificación, haciendo 3 repeticiones por cada muestra de leche, lo que origina un total de 45 valores de concentración de Ptaquilósido.

El tipo de diseño es de: Bloques Completamente al Azar (DCA)

Características del experimento:

- Son 5 muestras de leche recolectadas en 3 alturas diferentes (tratamientos).

Tabla 3.0.1 Alturas de recolección de muestras, Tratamientos

Tratamiento	Altitud (msnm)	Lugar
T1	1635	Tronador grande
T2	1599	Tronador grande
T3	1404	Tronador grande

La cuantificación del Ptaquilósido se realiza 3 repeticiones de cada muestra por cada altitud

**Tabla 3.0.2 Muestras de leche para cuantificación de Ptaquilósido,
Combinaciones x 3 repeticiones**

	M1	M2	M3	M4	M5
T1	T1M1	T1M2	T1M3	T1M4	T1M5
	T1M1	T1M2	T1M3	T1M4	T1M5
	T1M1	T1M2	T1M3	T1M4	T1M5
T2	T2M1	T2M2	T2M3	T2M4	T2M5
	T2M1	T2M2	T2M3	T2M4	T2M5
	T2M1	T2M2	T2M3	T2M4	T2M5
T3	T3M1	T3M2	T3M3	T3M4	T3M5
	T3M1	T3M2	T3M3	T3M4	T3M5
	T3M1	T3M2	T3M3	T3M4	T3M5

3.4 Variables:

3.4.1 Independiente. Altura

3.4.2 Dependientes. Concentración de Ptaquilósido en leche

3.5 Técnicas e instrumentos analíticos:

3.5.1 Metodología para la preparación del estándar. La preparación de la solución madre del estándar y sus diluciones se toma un equivalente a 250mg del estándar de ptaquilósido con una pureza de 97% en un balón aforado de 50ml, se disuelve en agua destilada como solvente inicial, se agita a temperatura ambiente durante 45 minutos en baño ultrasonico, se filtra utilizando papel filtro, se deja decantar, se separa el sobrenadante y se desecha el residuo y el sobrenadante se extrae 2 veces con porciones de 50ml de éter de petróleo, el éter se desecha y la solución final se añade hidróxido de sodio 0.1 M, se lleva a un $\text{pH} \geq 11$, posteriormente calentar a 40°C durante 1 hora, inmediatamente se agrega ácido clorhídrico y se lleva hasta un $\text{pH} \leq 2$, se deja reposar 10 minutos y se extrae con 25 ml de diclorometano por 3 veces, aboteniéndose así la solución madre; a partir de esta solución madre se realiza 10 diluciones utilizando agua destilada como disolvente en concentraciones de: 1 mg/ml, 0.9 mg/ml, 0.7 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.09 mg/ml, 0.07mg/ml, 0.05 mg/ml y 0.01 mg/ml de ptaquilósido.

Cada una de estas diluciones, se lleva a sequedad en rotavapor a 40°C y se re disuelve con 1ml de metanol, una vez preparado los estándares se procede a realizar las lecturas en HPLC, obteniéndose las áreas y tiempo de retención para cada concentración, con los datos obtenidos se procede a realizar la curva del estándar relacionando la concentración con el área que se obtiene para cada una ellas.

3.5.2 Metodología para la obtención de Ptaquilósido en muestras de leche. Se recolectaron 5 muestras de leche de ganado vacuno por cada altura (1635, 1599, 1404 m.s.n.m), de la zona de Tronador Grande – Provincia de Bolívar. La recolección de las muestras se realiza en diferentes fincas ubicadas en esta zona.

- Las muestras de leche fueron obtenidas de vacas que presentan signos de hematuria enzoótica bovina en el primer ordeño de la mañana.
- Se toma 100ml de leche y se coloca en frascos de vidrio de color ámbar de 125ml, bien identificados, se trasladan al laboratorio en condiciones de refrigeración en donde se procesa de manera inmediata.

- De cada una de las muestras recolectadas se procede a precipitar las proteínas para lo cual se toma una alícuota de 25ml, se lleva a un balón aforado de 100ml y se afora con 75ml de metanol, se agita a temperatura de 36°C durante 30 minutos utilizando un baño ultrasónico, posteriormente la solución se filtra con papel filtro y se centrifuga a 3000 rpm, durante 15 minutos. La solución luego de centrifugar, para precipitar los lípidos, se procede a separar el sobrenadante en un erlenmeyer y se añade 25 ml de acetonitrilo, se lleva nuevamente a centrifugación durante 15 minutos y se desecha el pellet que está constituido por lípidos y proteínas restantes.
- Para extraer las grasas de la solución centrifugada se toma una alícuota de 10ml, se coloca en un embudo de separación, se añade 1 g de cloruro de sodio y 10ml de diclorometano, se agita.
- El Ptaquilósido se convierte en pterosin b debido a que es la manera en la que se puede cuantificar esta molécula mediante HPLC, para lo cual, la solución anterior se separa y la fase acuosa se coloca en un erlenmeyer, se le añade hidróxido de sodio 0,003N hasta llevar a pH básico, la solución se agita en baño ultrasónico a temperatura de 36°C durante 2 horas, se trasvasa a un embudo de separación y se añade 15 ml de diclorometano, se agita y se extrae la fase orgánica este procedimiento se repite por 3 veces.
- El extracto de diclorometano se concentra a presión reducida en rotavapor a temperatura de 40°C hasta sequedad. Para la cuantificación de Ptaquilósido el residuo se re disuelve en 10 ml de metanol grado HPLC, se filtra y se toma 1ml, se coloca en viales de autosampler y se procede a desarrollar la cromatografía en el equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia Dionex Ultimate 3000, mediante modo isocrático por columna de fase reversa.

Técnica facilitada por: Lic. Luz María Sánchez Perera, Lic. Betty Mancebo Dorvigny, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, CENSA, Cuba.

3.6 Instrumentos analíticos:

Primera fase.

Recolección de leche:

a) Materiales

- Frascos ámbar 125ml
- Nevera
- Etiquetas
- Cuaderno

b) Procedimiento

- Recolección manual
 - *Mañana día 1:* Se proporcionó frascos a los señores encargados del primer ordeño.
 - *Tarde día 1:* Se retiró los frascos con las muestras de leche recolectadas
- Depositar en el sistema de enfriamiento.

Segunda fase

Extracción y determinación de Ptaquilósido

a) Materiales

- Matraces erlenmeyer de 125 ml.
- Balones aforados 100ml, 50ml.
- Embudos de separación 250ml.
- Embudos de vidrio
- Papel filtro MN 615. 125 mm
- Soporte universal
- Pinzas para embudos
- Balanza granataria
- Agitador magnético
- Baño ultrasónico

- Probetas
- Micro pipetas
- Centrifugadora
- Refrigeradora
- Equipo de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia HPLC, Dionex Ultramate 3000, mediante modo isocrático por columna de fase reversa.
- Viales de HPLC Autosampler

Reactivos para la extracción y determinación de Ptaquilósido

- Ácido clorhídrico (HCl)
- Diclorometano (CH_2Cl_2)
- Metanol (CH_3OH)
- Acetonitrilo (CH_3CN)
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Hidroxido de Sodio (NaOH)

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.2 Análisis y discusión de resultados

4.2.1 Curva del estándar de Ptaquilósido. Para construir la curva estándar se pesó un equivalente de 250mg del estándar de Ptaquilósido con el 97% de pureza.

- Peso del estándar: 250mg
- Corrección por la pureza del estándar :

$$250\text{mg} \quad 100\%$$

$$X = \quad 97\%$$

X= 257.732 mg de Ptaquilósido que se pesó.

Para la preparación de la solución estándar se toma 257.732mg de Ptaquilósido y se afora en un balón de 50ml con agua, esta solución estándar corresponde a una concentración de 5.00mg/ml, a partir de esta solución se procede a preparar las diluciones, con el siguiente cálculo:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

En donde:

C1: Concentración de la solución estándar de Ptaquilósido.

C2: Concentración de Ptaquilósido de cada una de las diluciones.

V1: Volumen de la solución estándar tomado para la preparación de las diluciones

V2: Volumen preparado de cada dilución.

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1}$$

$$V_1 = \frac{0.010 \text{ mg/ml} \times 50 \text{ ml}}{5.000 \text{ mg/ml}}$$

$$V_1 = 0.1 \text{ ml}$$

Resultados:

La siguiente tabla muestra las concentraciones de las diluciones preparadas:

Tabla 4.1 Concentración final de las diluciones		
Volumen de solución estándar (5.00mg/ml)	Volumen de disolvente (V₂) (ml)	Concentración final (C₂) (mg/ml)
0.10	49.90	0.01
0.50	49.50	0.05
0.70	49.30	0.07
0.90	49.10	0.09
1.10	48.90	0.11
5.00	45.00	0.50
7.00	43.00	0.70
9.00	41.00	0.90
11.00	39.00	1.10

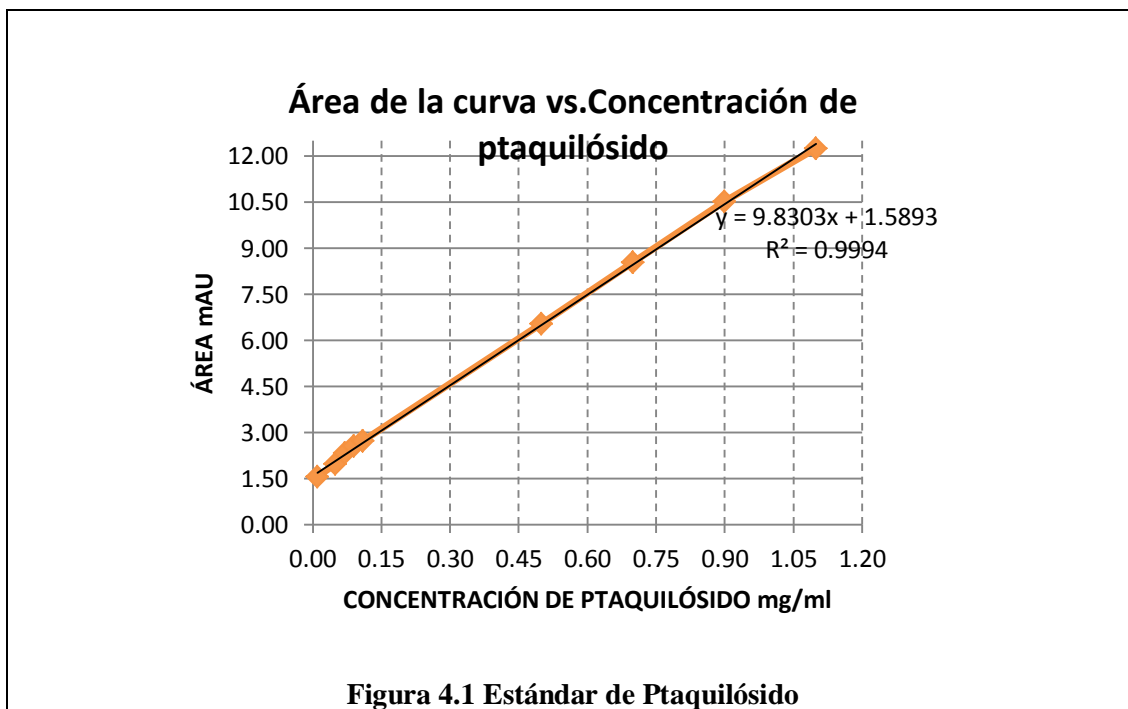
Una vez preparadas las diluciones se procede a construir la curva de calibración, para lo cual se toma 1ml de cada uno de las diluciones y se coloca en viales de autosampler, se desarrolla la cromatografía en el equipo de Cromatografía líquida de Alta Eficiencia HPLC, y se mide el área que corresponde a la concentración de Ptaquilósido de cada dilución, se utiliza un detector ultravioleta a una longitud de onda de 260nm. Este procedimiento se repite por 3 veces.

Los resultados de las áreas obtenidas se resumen en la siguiente tabla:

**Tabla 4.2 Relación de áreas obtenidas con respecto a la concentración
De las diferentes diluciones del estándar de Ptaquilósido**

Conc. (mg/ml)	Área Lectura 1	Área Lectura 2	Área Lectura 3	Área promedio de las 3 lecturas X̄
0.010	1.562	1.57	1.542	1.558
0.050	1.981	1.982	1.979	1.981
0.070	2.331	2.314	2.333	2.326
0.090	2.547	2.551	2.552	2.550
0.110	2.717	2.721	2.723	2.720
0.500	6.544	6.538	6.542	6.541
0.700	8.853	8.023	8.762	8.546
0.900	10.535	10.524	10.528	10.529
11.00	12.223	12.289	12.249	12.254

Con estos resultados se procede a realizar la gráfica de la curva del estándar de Ptaquilósido a las diferentes concentraciones:



La gráfica indica la curva de calibración que relaciona la concentración de Ptaquilósido con el área de la curva leída en HPLC, en el eje de las “Y” se grafica el área que corresponde a la variable dependiente, y en el eje de las “X” se grafica las concentraciones que corresponde a la variable independiente.

Al aplicar regresión lineal a los datos se obtuvo la ecuación de la recta que se expresó:

$$y = ax + b$$

En donde:

y= área o absorbancia de Ptaquilósido

a= pendiente

x= concentración de Ptaquilósido

b= intercepto con el eje

Por tanto, la ecuación de la recta obtenida es:

$$y = 9.8302x + 1.5894$$

La curva es lineal demostrando que existe una relación directa entre las concentraciones de Ptaquilósido y el área de la curva.

4.2.2 Resultados de la determinación de concentración de Ptaquilósido en muestras de leche.

Una vez tratada la leche se procede a cuantificar el Ptaquilósido en las 5 muestras de leche recolectadas a 1636 m.s.n.m (tratamiento 1), se coloca en viales de autosampler y se procede a desarrollar la cromatografía en el equipo de Cromatografía líquida de Alta Eficiencia HPLC, se mide el área que corresponde a la concentración de Ptaquilósido de cada muestra, utilizando un detector ultravioleta a una longitud de onda de 260nm.

Este procedimiento se repite por 3 veces y se procede de igual manera para tratamiento 2 y 3

Los resultados de las áreas obtenidas para cada tratamiento se detallan en las tablas 4.3, 4.4, 4.5.

Altura 1635 m.s.n.m (tratamiento 1):

Tabla 4.3 Valores de Área de Ptaquilósido en muestras de leche, 1635 m.s.n.m

MUESTRA	Área			
	Área	Área	Área	Promedio de
	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	las 3 lecturas
				X
M1	2.621	2.589	2.618	2.609
M2	2.598	2.579	2.572	2.583
M3	2.641	2.579	2.559	2.593
M4	2.532	2.527	2.515	2.525
M5	2.520	2.518	2.510	2.516

Altura 1599 m.s.n.m (tratamiento 2):

Tabla 4.4 Valores de Área de Ptaquilósido en muestras de leche, 1599 m.s.n.m

MUESTRA	Área			
	Área	Área	Área	Promedio de las 3
	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	lecturas
				X
M1	2.472	2.464	2.456	2.464
M2	2.475	2.487	2.481	2.481
M3	2.488	2.476	2.441	2.468
M4	2.484	2.453	2.439	2.459
M5	2.487	2.475	2.459	2.474

Altura 1404 m.s.n.m (tratamiento 3):

Los resultados de las áreas obtenidas se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 4.5 Valores de Área de Ptaquilósido en muestras de leche, 1404 m.s.n.m				
MUESTRA	Área	Área	Área	Área
	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Promedio de las 3 lecturas
				X
M1	2.362	2.336	2.329	2.342
M2	2.422	2.390	2.361	2.391
M3	2.382	2.363	2.309	2.351
M4	2.403	2.372	2.337	2.371
M5	2.426	2.395	2.382	2.401

4.3 Interpretación de resultados:

- Cálculo de la concentración de Ptaquilósido en muestras de leche:

Para calcular la concentración de Ptaquilósido en cada una de las muestras de leche se relaciona el área que se obtiene en la lectura de HPLC con las áreas obtenidas para cada dilución del estándar, para lo cual se utiliza la siguiente ecuación que corresponde a la ecuación de la recta.

$$Y = 9.8302x + 1.5894$$

En donde:

y= área obtenida de la cada muestra de leche.

x= concentración de Ptaquilósido en leche (variable a calcular).

Se procede a calcular la concentración para cada una de las muestras de la siguiente manera:

Altura 1635 m.s.n.m (tratamiento 1):

$$Y = 9.8302x + 1.5894$$

$$x = \frac{y - 1.5894}{9.8302}$$

$$x = \frac{2.621 - 1.5894}{9.8302}$$

$$x = 0.105 \text{ mg/ml}$$

Los resultados obtenidos de la manera anteriormente expuesta se resumen en la tabla 4.6.

Tabla 4.6 Valores de área y Concentración de Ptaquilósido en muestras de leche, 1635 m.s.n.m

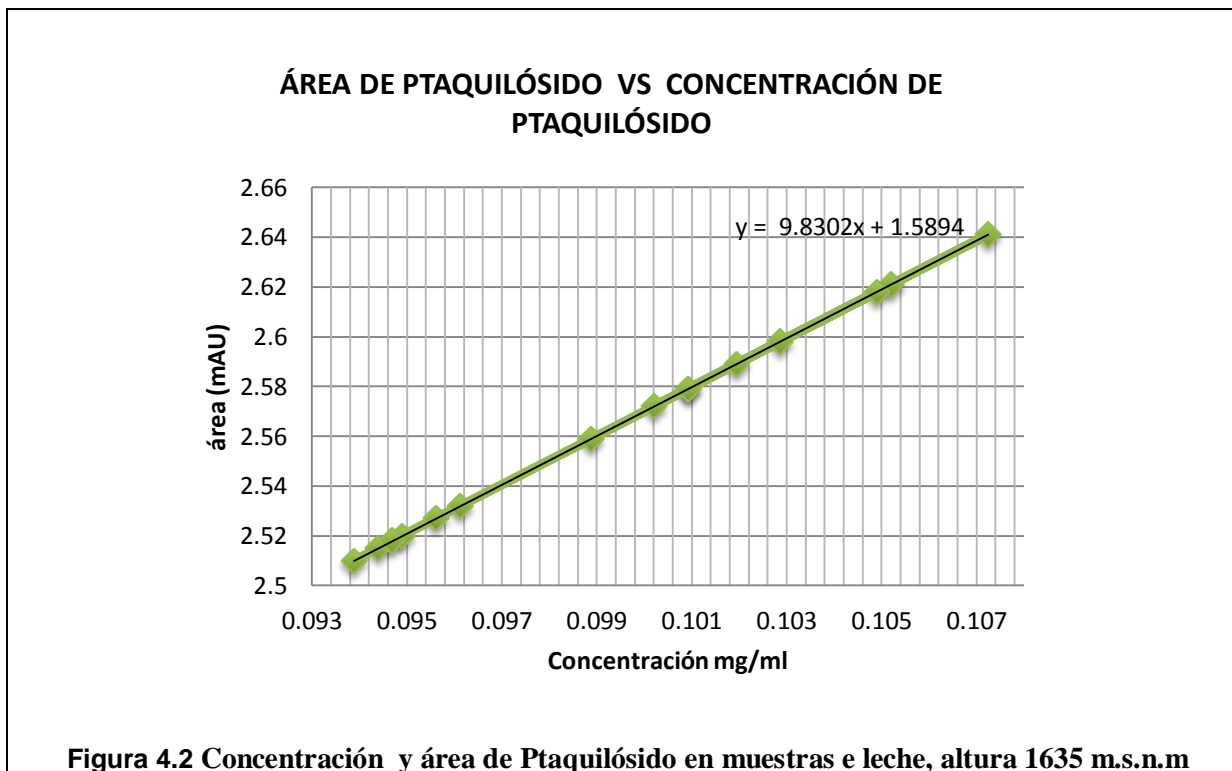
MUESTRA	Lectura	Concentración	Lectura	Concentración	Lectura	Concentración
	1	mg/ml	2	mg/ml	3	mg/ml
M1	2.621	0.105	2.589	0.102	2.618	0.105
M2	2.598	0.103	2.579	0.101	2.572	0.100
M3	2.641	0.107	2.579	0.101	2.559	0.099
M4	2.532	0.096	2.527	0.096	2.515	0.094
M5	2.52	0.095	2.518	0.095	2.510	0.094

En la tabla a continuación se expresa las concentraciones de Ptaquilósido en las muestras de leche y el promedio de las 3 lecturas realizadas.

Tabla 4.7 Valores de concentración de Ptaquilósido en muestras de leche, 1635 m.s.n.m

MUESTRA	LECTURA 1	LECTURA 2	LECTURA 3	Concentración promedio de las 3 lecturas
	Concentración	Concentración	Concentración	
	mg/ml	mg/ml	mg/ml	X
M1	0.105	0.102	0.105	0.104
M2	0.103	0.101	0.100	0.101
M3	0.107	0.101	0.099	0.102
M4	0.096	0.096	0.094	0.095
M5	0.095	0.095	0.094	0.095
			X	0.100

Con los resultados conseguidos se obtiene la siguiente curva relacionando el área obtenida en el HPLC y la concentración de Ptaquilósido hallado en las muestras de leche a la altura de 1635 m.s.n.m (tratamiento1):



Altura 1599 m.s.n.m (tratamiento 2):

Los resultados de las concentraciones obtenidas se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 4.8 Valores de área y Concentración de Ptaquilósido en muestras de leche, 1599 m.s.n.m

MUESTRA	Lectura	Concentración	Lectura	Concentración	Lectura	Concentración
	1	mg/ml	2	mg/ml	3	mg/ml
M1	2.472	0.090	2.464	0.089	2.456	0.088
M2	2.475	0.090	2.487	0.091	2.481	0.091
M3	2.488	0.091	2.476	0.090	2.441	0.087
M4	2.484	0.091	2.453	0.088	2.439	0.086
M5	2.487	0.091	2.475	0.090	2.459	0.088

En la tabla a continuación se expresa las concentraciones de Ptaquilósido en las muestras de leche y el promedio de las 3 lecturas realizadas.

Tabla 4.9 Valores de concentración de Ptaquilósido en muestras de leche, 1599 m.s.n.m

	LECTURA 1	LECTURA 2	LECTURA 3	concentración promedio de las 3 lecturas
MUESTRA	Concentración	Concentración	Concentración	
	mg/ml	mg/ml	mg/ml	X
M1	0.09	0.089	0.088	0.089
M2	0.09	0.091	0.091	0.091
M3	0.091	0.09	0.087	0.089
M4	0.091	0.088	0.086	0.088
M5	0.091	0.09	0.088	0.090
			X	0.090

La siguiente gráfica corresponde a la relación entre el área obtenida en el HPLC y la concentración de Ptaquilósido hallado en las muestras de leche a la altura de 1599 m.s.n.m (tratamiento 2):

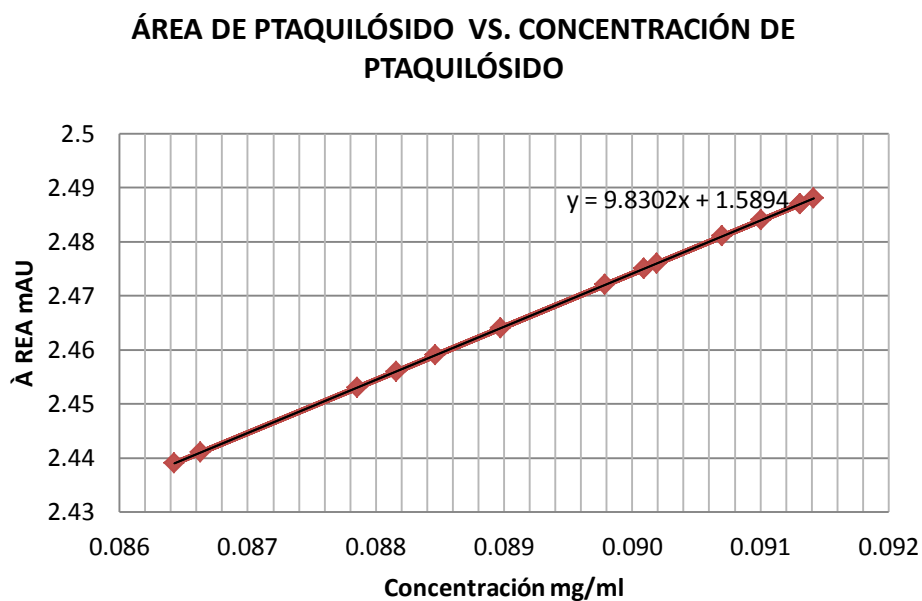


Figura 4.3 Concentración área de Ptaquilósido en muestras de leche, altura 1599 m.s.n.m.

Altura 1404 m.s.n.m (tratamiento 3):

Los resultados de las concentraciones obtenidas se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 4.10 Valores de área y Concentración de Ptaquilósido en muestras de leche, 1404 m.s.n.m

MUESTR	Lectura	Concentración	Lectura	Concentración	Lectura	Concentración
A	1	mg/ml	2	mg/ml	3	mg/ml
M1	2.362	0.079	2.336	0.076	2.329	0.075
M2	2.422	0.085	2.390	0.081	2.361	0.078
M3	2.382	0.081	2.363	0.079	2.309	0.073
M4	2.403	0.083	2.372	0.080	2.337	0.076
M5	2.426	0.085	2.395	0.082	2.382	0.081

En la tabla a continuación se expresa las concentraciones de Ptaquilósido en las muestras de leche y el promedio de las 3 lecturas realizadas.

Tabla 4.11 valores de concentración de Ptaquilósido en muestras de leche, 1404 m.s.n.m

MUESTRA	LECTURA 1 Concentración	LECTURA 2 Concentración	LECTURA 3 Concentración	concentración promedio de las 3 lecturas
	mg/ml	mg/ml	mg/ml	X
M1	0,079	0,076	0,075	0,077
M2	0,085	0,081	0,078	0,081
M3	0,081	0,079	0,073	0,078
M4	0,083	0,08	0,076	0,080
M5	0,085	0,082	0,081	0,083
			X	0,080

La siguiente gráfica corresponde a la relación entre el área obtenida en el HPLC y la concentración de Ptaquilósido hallado en las muestras de leche a la altura de 1404 m.s.n.m (tratamiento 3):

**ÁREA DE PTAQUILÓSIDO
VS. CONCENTRACIÓN DE PTAQUILÓSIDO**

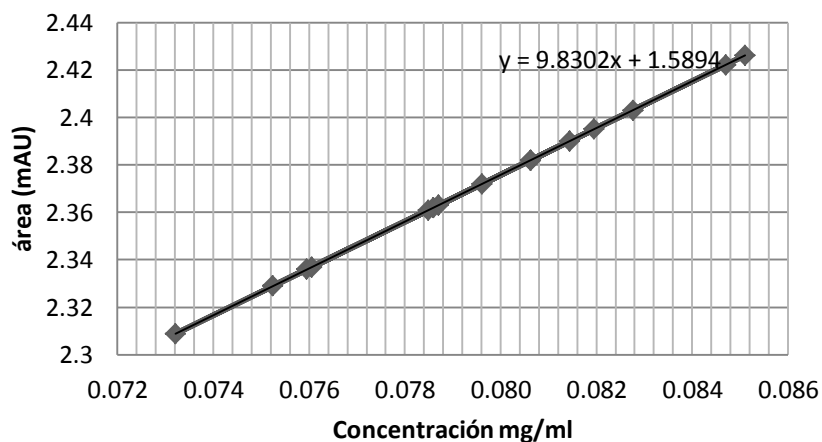


Figura 4.4 Concentración y área de Ptaquilósido en muestras e leche, altura 1404 m.s.n.m

Para tener una mejor apreciación de la curva del estándar de Ptaquilósido y poder interpretar los resultados de las concentraciones obtenidas en las muestras de leche, se procede a graficar las concentraciones de las diluciones iniciales del estándar de Ptaquilósido con sus respectivas áreas.

**Tabla 4.12 Concentración y áreas obtenidas de las diluciones
iniciales del estándar de Ptaquilósido**

Conc. (mg/ml)	Área \bar{X}
0.010	1.558
0.050	1.981
0.070	2.326
0.090	2.550
0.110	2.720

Donde se obtiene la siguiente gráfica:

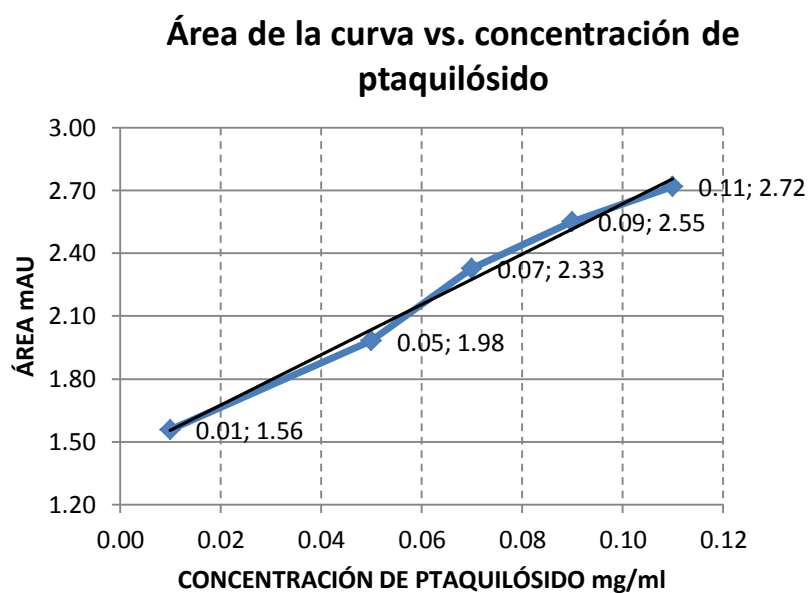


Figura 4.5 Estándar de Ptaquilósido, ampliación de valores iniciales

Con la ayuda de la figura 4.5, se relaciona la curva del estándar con los valores medios de concentración de Ptaquilósido obtenidos en las muestras de leche recolectadas a las 3 alturas diferentes.

Tabla 4. 13 Valores medios de área y concentración de Ptaquilósido en muestras de leche a las diferentes alturas

Tratamiento	Altura m.s.n.m	Área mAU	Concentración mg/ml
T1	1635	2.565	0.100
T2	1599	2.469	0.090
T3	1404	2.371	0.080

Donde se obtuvo la siguiente figura 4.6, determinando que en las muestras de leche existe la presencia de Ptaquilósido.

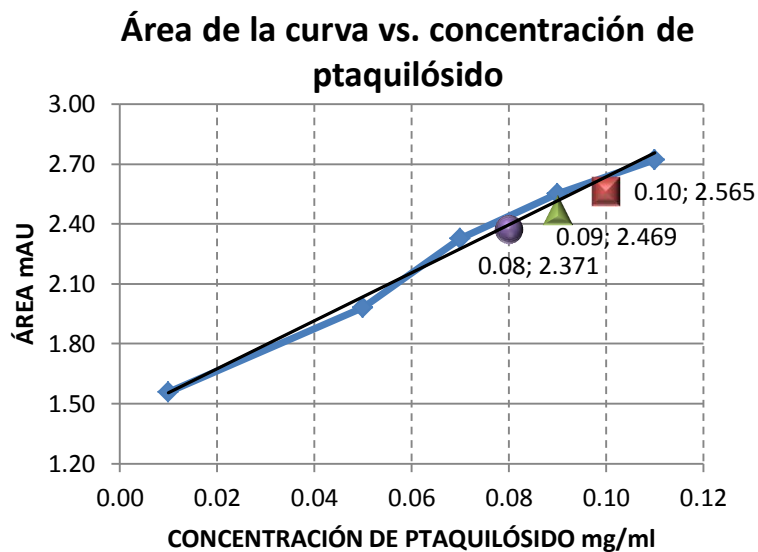


Figura 4.6 Relación de la concentración de Ptaquilósido con la concentración media de Ptaquilósido en las muestras de leche recolectadas a las diferentes alturas

Además, con los valores medios de concentración de Ptaquilósido obtenidos en las muestras de leche y conociendo las alturas de recolección se obtuvo la siguiente figura 4.7, determinando una relación directamente proporcional entre estos dos factores.

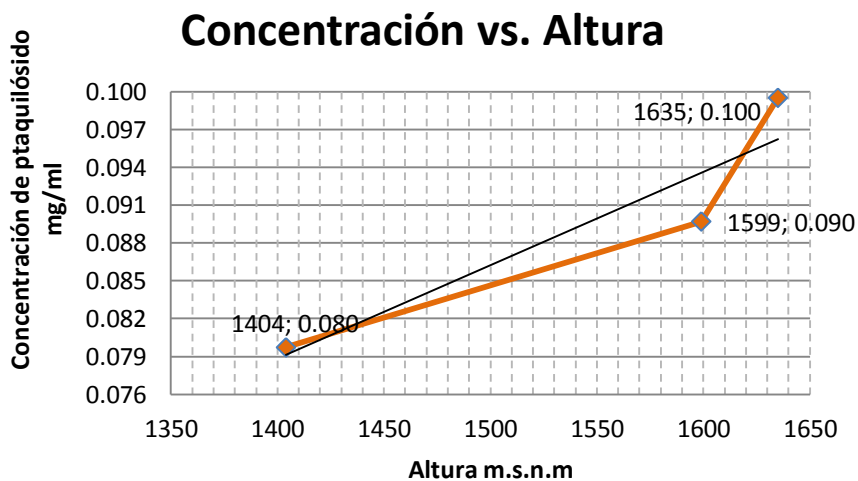


Figura 4.7 Relación de altura y Concentración de Ptaquilósido en muestras de leche.

Se debe tomar en cuenta que las concentraciones de ptaquilósido halladas corresponden a los 25ml de leche recolectada y para expresar la concentración de ptaquilósido en 1L de leche se hace el siguiente cálculo:

Altura 1635 m.s.n.m (tratamiento 1):

$$\begin{array}{rcl} 0.100\text{mg} & & 25\text{ml de leche} \\ \times & & 1000\text{ml de leche} \end{array}$$

$$\mathbf{X = 4\text{mg/L de leche.}}$$

Obteniéndose la siguiente tabla:

Tabla 4.14 Concentraciones de Ptaquilósido en un litro de leche

Tratamiento	Altura m.s.n.m	Concentración mg/ml	Concentración mg/L
T1	1635	0.100	4
T2	1599	0.090	3.6
T3	1404	0.080	3.2

Análisis estadístico:

Se realizó el análisis estadístico de los resultados de concentración de Ptaquilósido obtenidos en las muestras de leche; como única variable la altura, se determinó mediante un análisis de estadígrafos conociendo así el nivel de confiabilidad del trabajo, además, un diseño factorial de 5 x 3, y un análisis de ADEVA, obteniéndose los siguientes resultados:

Análisis estadístico 1635 m.s.n.m. (tratamiento 1):

Tabla 4.15 Estadígrafos de posición y de dispersión, 1635 m.s.n.m

ESTADÍGRAFOS DE POSICIÓN	
Media	0.10
Mediana	0.10
Moda	0.10
ESTADÍGRAFOS DE DISPERSIÓN	
Varianza	0.00
Desviación típica	0.00
Coefficiente de variación	4.43%

Tabla 4.16 Intervalos de confianza

Extremo izquierdo	Extremo derecho	Con un nivel de
0.10	0.10	confiabilidad del 95 %
Extremo izquierdo	Extremo derecho	Con un nivel de
0.10	0.10	confiabilidad del 99 %
Extremo izquierdo	Extremo derecho	Con un nivel de
0.09	0.10	confiabilidad del 99,9 %

Para la altura 1635 m.s.n.m (Tratamiento 1), se obtuvo un coeficiente de variación de 4.43% , y un nivel de confiabilidad del 99%.

Análisis estadístico 1599 m.s.n.m. (Tratamiento n° 2):

Tabla 4.17 Estadígrafos de posición y de dispersión, 1599 m.s.n.m
ESTADÍGRAFOS DE POSICIÓN

Media	0.09
Mediana	0.09
Moda	0.09

ESTADÍGRAFOS DE DISPERSIÓN

Varianza	0.00
Desviación típica	0.00
Coeficiente de variación	1.86%

Tabla 4.18 Tabla. Intervalos de confianza, 1599 m.s.n.m

Extremo izquierdo	Extremo derecho	Con un nivel de
0.09	0.09	confiabilidad del 95 %
Extremo izquierdo	Extremo derecho	Con un nivel de
0.09	0.09	confiabilidad del 99 %
Extremo izquierdo	Extremo derecho	Con un nivel de
0.09	0.09	confiabilidad del 99,9 %

Para la altura 1599 m.s.n.m (Tratamiento 2), se obtuvo un coeficiente de variación de 1,86% , pero un mismo nivel de confiabilidad del 99%.

Análisis estadístico 1404 m.s.n.m. (Tratamiento n° 3):

Tabla 4.19 Estadígrafos de posición y de dispersión, 1404 m.s.n.m
ESTADÍGRAFOS DE POSICIÓN

Media	0.08
Mediana	0.08
Moda	0.08
ESTADÍGRAFOS DE DISPERSIÓN	
Varianza	0.00
Desviación típica	0.00
Coeficiente de variación	4.34%

Tabla 4.20 Intervalos de confianza, 1404 m.s.n.m
INTERVALOS DE CONFIANZA

Extremo izquierdo	Extremo derecho	Con un nivel de
0.08	0.08	confiabilidad del 95 %
Extremo izquierdo	Extremo derecho	Con un nivel de
0.08	0.08	confiabilidad del 99 %
Extremo izquierdo	Extremo derecho	Con un nivel de
0.08	0.08	confiabilidad del 99,9 %

Para la altura 1404 m.s.n.m (Tratamiento 3), se obtuvo un coeficiente de variación de 4.34%, y un nivel de confiabilidad del 99%.

Los resultados del análisis de varianza son los siguientes:

Tabla 4.21 Concentración de Ptaquilósido en muestras de leche a diferentes alturas.

TRATAMIENTOS	M1			M2			M3			M4			M5			TOTAL
	Lectura	Lectura	Lectura	Lectura	Lectura	Lectura	Lectura	Lectura	Lectura	Lectura	Lectura	Lectura	Lectura	Lectura	Lectura	
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
T1 1635 m.s.n.m	0.105	0.102	0.105	0.103	0.101	0.100	0.107	0.101	0.099	0.096	0.096	0.094	0.095	0.095	0.094	1.493
T2 1599 m.s.n.m	0.090	0.089	0.088	0.090	0.092	0.091	0.092	0.090	0.087	0.091	0.088	0.087	0.092	0.090	0.089	1.346
T3 1404 m.s.n.m	0.079	0.076	0.075	0.085	0.082	0.079	0.081	0.079	0.073	0.083	0.080	0.076	0.085	0.082	0.081	1.196
Σ	0.274	0.267	0.269	0.278	0.274	0.270	0.280	0.270	0.259	0.270	0.263	0.257	0.272	0.267	0.263	4.034

Tabla 4.22 Diseño experimental.

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.0029404	2	0.0014702	127.68	1.4093E-18	3.22
Dentro de los grupos	0.0004836	42	1.1514E-05			
Total	0.003424	44				

Interpretación

La hipótesis es alternativa porque existe un resultado significativo, es decir, la F calculada es mayor que F tabulada, por lo tanto, se demuestra la presencia de Ptaquilósido en las muestras de leche de ganado vacuno que pastorea zonas donde crece *Pteridium arachnoideum* en la provincia de Bolívar.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.2 Conclusiones

- A través de la investigación, se encontró la presencia de Ptaquilósido en un rango de concentración de 0.08mg/25ml de leche a 1.0mg/25ml de leche, en las 15 muestras procedentes del ganado vacuno que pastorea en 3 diferentes alturas (1404m.s.n.m, 1599m.s.n.m, 1635m.s.n.m) en la zona de Tronador Grande, provincia de Bolívar, de esta manera vemos que en un litro de leche para la altura de 1635m.s.n.m hay 4mg/L de Ptaquilósido, para una altura de 1599 m.s.n.m tenemos 3.6mg/L, mientras que para una altura de 1404 m.s.n.m hay 3.2mg/L.
- Al relacionar la concentración de Ptaquilósido encontrado en las muestras de leche con las diferentes alturas de recolección, se determinó que la leche del ganado vacuno que pastorea zonas de mayor altura (1635 m.s.n.m) presenta una mayor concentración de Ptaquilósido (0.10mg/25ml de leche), mientras que la leche del ganado que pastorea zonas de menor altura (1404 m.s.n.m) presenta una menor concentración (0.080mg/25ml de leche), por lo tanto se puede concluir que existe una relación directa, entre la altura y la concentración de Ptaquilósido, además en base a esta relación se puede establecer un vínculo entre la altura, la planta (*Pteridium arachnoideum*) y la concentración de ptaquilósido hallada en la leche, es decir, a mayor altura existirá un mayor crecimiento de la planta y a su vez una mayor concentración de ptaquilósido en la leche de ganado vacuno que pastorea estas zonas.
- En Costa Rica, Colombia y Venezuela se ha demostrado una relación entre cáncer gástrico y consumo de leche producida por el ganado vacuno que se alimenta con *Pteridium arachnoideum* (Villalobos-Salazar, 1985) (Somvanshi R, 2006), considerando este antecedente y las concentraciones de Ptaquilósido halladas en la leche de ganado vacuno de la zona de Tronador Grande provincia de Bolívar, mediante esta investigación, se puede establecer el potencial peligro del consumo de leche de animales que pastorean en zonas invadidas por *Pteridium*, especialmente si la leche se consume sin pasteurizar.

5.3 Recomendaciones

- Se recomienda que la leche obtenida en las zonas donde crece el *Pteridium arachnoideum*, sea sometida a cocción o pasteurización, debido a que se ha demostrado que los niveles de Ptaquilósido disminuyen en un 26% y 52% respectivamente, posteriormente a dichos procesos.
- La leche para consumo humano debe ser previamente pasteurizada para evitar la presencia de Ptaquilósido, además de bacterias patógenas presentes en la leche por razones de ordeño y transporte.
- Trabajar conjuntamente y con el apoyo de instituciones relacionadas al tema como el Ministerio de Agricultura y el Ministerio de Salud, para realizar políticas de control de crecimiento de esta planta y compañías para la pasteurización de la leche de ganado vacuno, sobre todo en zonas ganaderas rurales, así mismo un estudio de prevalencia del cáncer gástrico en personas que consumen la leche de ganado vacuno que se alimenta con *Pteridium arachnoideum*.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, R. (2011). *La hemoglobina glicosilada*. Recuperado el Noviembre de 2012, de wikispaces: <http://bioquiwik1.wikispaces.com/La%20hemoglobina%20glicosilada>
- Alfredo Sánchez-Villalobos João Paulo Elsen Saut, I. A.-C. (Octubre 2008). Fases intermedias y simultáneas de los síndromes crónicos de la intoxicación por consumo de genotipos del pteridium en bovinos. En: *Revista Científica SCIELO*, http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0798-22592008000500002&script=sci_arttext, vol.18 no.5.
- Alonso-Amelot, M. E. (1999). Helecho macho, salud animal y salud humana. En: *Revista de la Facultad de Agronomía Universidad de Zulia Maracaibo-Venezuela*, http://www.revfacagronluz.org.ve/v16_5/v165z010.html, 528-541.
- Basagoiti, I. (12 de Enero de 2010). *Estómago: Anatomía*. Obtenido de Salupedia: <http://www.salupedia.org/salud/enlaces/393/el-estomago-anatomia->
- Calderón Tobar, Á., Marrero Faz, E., Murillo, V., & Vega, V. (Oct.-Dic. 2011). Reporte de casos de hematuria enzoótica bovina por ingestión de Pteridium arachnoideum en la región ganadera de San Miguel de Bolívar, provincia Bolívar, Ecuador. En: *Rev Salud Anim. vol.33 no.3 La Habana*, http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0253-570X2011000300009&script=sci_arttext.
- Chemicals, M. (2013). *Ácido butírico*. Recuperado el 10 de Febrero de 2013, de Merck Millipore: http://www.merckmillipore.com/chemicals/acido-n-butirico/MDA_CHEM-800457/spanish/p_9OSb.s1LH_IAAAEWh.EfVhTl
- Cueva, P., & Yepez, J. (2009). Estómago. En *Epidemiología del cáncer en Quito 2003-2005*. <http://www.sociedadecuatorianadeoncologia.org/pdf/epidemiologiaQuito0305.pdf>.
- Delgado, M., Rojas, D., Tamayo, E., Jorgue, A., & Usma, M. e. (2009). Hematuria Enzoótica bovina, una patología olvidada en Colombia. En: *Boletín Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*. (págs. 21-26). <http://csi.uan.edu.co/dni/pdf/Boletin%20VETERINARIA%20SIRINGE1.pdf>.
- Diaz Rubio, E., & García Conde, J. (2000). Cáncer de Estómago. En *Oncología Clínica Básica* (págs. 40-48). España: Arán Ediciones.
- Díaz, F., Betancourt, D., Blanco, M., & García, M. (1999). *Diagnóstico de las lesiones proliferativas de la vejiga y otras Cistopatías*. Recuperado el 22 de Enero de 2013, de En: *Revista Medisan*: http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol3_2_99/san08299.pdf
- Escobar, B. F. (Febrero de 2006). *Cáncer gástrico*. Recuperado el 19 de Diciembre de 2012, de Cirugest: <http://www.cirugest.com/htm/revisiones/cir13-06/13-06-02.htm>

- Espejo Romero, H., & Navarrete Siancas, J. (Julio de 2003). *Clasificación de los Adenocarcinomas de estómago*. Recuperado el 28 de Diciembre de 2012, de En: Rev. gastroenterol, Peú online: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1022-51292003000300006
- Evans, W. (1976). Bracken thiaminase-mediated neurotoxic syndromes. En: *Botanical Journal of the Linnean Societ*, Article first published online: 28 JUN 2008 (págs. 113-131). <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1095-8339.1976.tb02017.x/abstract;jsessionid=05EE83D0DAF733DAB0DE73A3090E02CD.d01t01?deniedAccessCustomisedMessage=&userIsAuthenticated=false>.
- Flores-Cabral, Vojvodic, D., O., & E, L. (2004). Factores asociados a la mortalidad postoperatoria luego de cirugía por adenocarcinoma gástrico en el Hospital Edgardo Rebagliati Martins. En *Revista de Gastroenterología del Perú*. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1022-51292004000300003.
- Gil, A. (2010). Tratado de nutrición, Composición y calidad nutritiva de los alimentos. Madrid: Médica Panamericana.
- González, C. (2001). *Introducción a los Métodos Cromatográficos*. Recuperado el 21 de Diciembre de 2012, de http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course_files/Tema_10.pdf
- Gupta, M. P. (2008). Plantas medicinales ineroamericanas. En *Organización del Convenio Andrés Bello* (pág. 43). Bogota: Iberoamericana, http://books.google.com.ec/books/about/Plantas_medicinales_iberamericanos.html?id=uxY6QwAACAAJ&redir_esc=y.
- Guzmán, V. (2010). Avances en el diagnóstico de la hematuria vesical. Lima-Perú, Universidad nacional de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria: http://www.cybertesis.edu.pe/sisbib/2010/guzman_sv/pdf/guzman_sv.pdf.
- King, M. W. (2011). *Principales funciones biológicas de los lípido*. Recuperado el 10 de Enero de 2013, de Química de los lípidos: <http://lipidosbiol.blogspot.com/2011/04/principales-funciones-biologicas-de-los.html>
- Lopez Santalla, M. (2006). Estudio de las Alteraciones de Linfocitos T de Sangre Periférica y de Mucosa en Pacientes con Adenocarcinoma Gástrico. Madrid, Facultad de Medicina, Universidad complutense de Madrid, España: <http://biblioteca.ucm.es/tesis/med/ucm-t29032.pdf>.
- Marin, R. E. (1997). *Hematuria Vesical Enzoótica Bovina “Meada de sangre” ó “Mal de orina” en la provincia de Jujuy*. Recuperado el 21 de Diciembre de 2012, de http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/intoxicaciones/121-Folleto-HEMATURIA.doc.pdf

- Marrero Evangelina, C. Á. (2012). Plantas tóxicas e inocuidad alimentaria: Hematuria Enzootica Bovina por *Pteridium* spp. un problema relevante de salud. *En: Revista Salud Animal. vol.34 no.3 La Habana*, http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0253-570X2012000300001&script=sci_arttext.
- Molina, F. (13 de Junio de 2002). *Tumores Malignos, Cáncer gástrico*. Recuperado el 8 de Diciembre de 2012, de <http://www.cirugest.com/htm/revisiones/cir13-06/13-06-02.htm>
- Moran, R. (2001). *Pteridium arachnoideum*. Recuperado el 10 de Diciembre de 2012, de PlantSystematics.org:
http://www.plantsystematics.org/imgs/robbin/r/Dennstaedtiaceae_Pteridium_arachnoideum_4184.html
- Moran, R. (20 de 04 de 2009). *Pteridium arachnoideum*. Recuperado el 15 de Enero de 2013, de Flora Mesoamericana:
<http://www.tropicos.org/Name/26606822?projectid=3&langid=66>
- Morante, Z., Sierra, I., & Del Hierro, I. (2007). Desarrollo de métodos analíticos para la separación quiral y su aplicación al estudio de procesos de síntesis asimétrica. Madrid: Dykinson,
http://books.google.com.ec/books/about/DESARROLLO_DE_M%C3%89TODOS_ANAL%C3%8DTICOS_PARA.html?id=PihmvNoXLZAC&redir_esc=y.
- Moreno, R. (2009). *Pteridium arachnoideum. Ecosistemas Argentinos, Boletín Informativo Nro. 40*,
<http://www.ecosistemasarg.org.ar/index.php?Modulo=boletines&Id=40&Titulo=Agosto-2009>.
- Napa, E. (2003). *Estómago*. Recuperado el 26 de Enero de 2013, de Medicina humana:
<http://www.mirevistamedica.net/Estomago.php>
- Nasanovsky, M. A., Garijo, R. D., & Kimmich, R. C. (Agosto de 2010). *Lechería*. Recuperado el 27 de Diciembre de 2012, de
<http://www.hipotesis.com.ar/hipotesis/Agosto2001/Catedras/Lecheria.htm>
- Niwa, H., Ojika, M., Wakamatsu, K., Yamada, K., Hirono, I., & Matsushita, K. (1983). Stereochemistry of ptaquiloside. En *Stereochemistry of ptaquiloside, a novel norsesquiterpene glucoside from bracken, Pteridium aquilinum var. latiusculum* (págs. 5371-5372).
http://www.researchgate.net/publication/232377731_Stereochemistry_of_ptaquiloside_a_novel_norsesquiterpene_glucoside_from_bracken_Pteridium_aquilinum_var._latiusculum.
- Nuñez, H., Peña, H., Montiel, A., Villalva, O., Pazos, J., & Diaz, G. (22 de Enero de 2011). *Cáncer de estómago, Slideshare*. Recuperado el 17 de Diciembre de 2012, de
<http://www.slideshare.net/hober184/cncer-de-estmago-7141639>

- Ortega, J. (1991). El género *Pteridium* en Venezuela: taxonomía y distribución geográfica. Biollania.
- Parris, L. (2011). *Estómago*. Recuperado el 20 de Enero de 2013, de eHow en Español: http://www.ehowenespanol.com/partes-del-estomago-humano-hechos_98188/
- Peredo, F. (2010). Citooncología Urinaria como Método de Ayuda Diagnóstica Precoz de la Hematuria Vesical Enzoótica Bovina. En F. Peredo. Lima-Perú: Universidad nacional mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, http://www.cybertesis.edu.pe/sisbib/2010/peredo_af/pdf/peredo_af-TH.1.pdf.
- Pierce. (2005). Genética del cáncer. En *Genética, un enfoque conceptual* (págs. 627-637). España: Panamericana.
- Piñol, F. (1998). Cáncer gástrico: factores de riesgo. *Revista Cubana de Oncología*, http://bvs.sld.cu/revistas/onc/vol14_3_98/onc06398.pdf, 171-179.
- Quattrocchi, O., Abelaira, S., & Laba, R. (2002). Cromatografía líquida. En *Introducción a la HPLC* (págs. 10-35). Argentina: Farros.
- Rasmussen, Lauren, Smith, & Hansen. (2008). Variation in ptaquiloside content in bracken (*Pteridium esculentum*). *Pteridium esculentum, Scientific Article*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19043468>.
- Rebhum, W. (1995). Enfermedades del ganado vacuno lechero. Zaragoza, España: Acribia.
- Revenga, J. (Abril, 2012). Intolerancia a la lactosa. *El nutricionista de la general*, <http://blogs.20minutos.es/el-nutricionista-de-la-general/tag/intolerancia-a-la-lactosa/>.
- Sanchez, M. (Mayo de 2012). *Fisiopatología del cáncer gástrico*. Recuperado el 10 de Enero de 2013, de En: inmaflorimar.blogspot.com: <http://inmaflorimar.blogspot.com/2012/05/fisiopatologia-del-cancer.html>
- Sierra, R. (2002). Cáncer gástrico, epidemiología y prevención. En: *Scielo, Acta Médica Costarricense*, http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0001-60022002000200003&script=sci_arttext.
- Skoog, L. (2007). Principios de la cromatografía. En *Análisis Instrumental 6ª Ed.* Barcelona: Reverté: Mc Graw Hill, http://books.google.com.ec/books?id=7FOyZbb7q8UC&pg=PA788&lpg=PA788&dq=skoo g+Principios+de+la+cromatografia&source=bl&ots=_OqnQSEEp&sig=LDz2Vch1C6urxKyDsRFt7KRpkLY&hl=es&sa=X&ei=IXyCUaelIov88QTjzYHICA&ved=0CDAQ6AEwAQ#v=onepage&q=skoog%20Pri.
- Somvanshi R, L. S. (2006). Estimation of the fern toxin, ptaquiloside, in certain Indian ferns other than bracken. *Curr Sci.* 2006, http://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=1691162&locale=es_ES.

- Spreer, E. (Octubre de 2011). *Propiedades Microbiológicas de la leche*. Recuperado el 28 de Enero de 2013, de microbiologia--lactea.blogspot: <http://microbiologia--lactea.blogspot.com/>
- Stuart, J., Marrero, E., Sánchez, L. M., Bulnes, C., & Palenzuela, I. (2006). Digestibilidad y contenido de factores antinutricionales en el helecho macho (*Pteridium aquilinum*) y plantas acompañantes en el Chaco húmedo boliviano. En: *Revista Prod. anim*, <http://www.reduc.edu.cu/147/06/2/14706214.pdf>.
- Stwar, J. (12 de Noviembre de 2011). *Composición de la leche*. Recuperado el 28 de Enero de 2013, de Agropecuarios, Producción de bovinos para leche: <http://agropecuarios.net/composicion-de-la-leche.html>
- Vaclavik, V. (2002). Leche y productos lácteos. En *Fundamentos de ciencia de los alimentos* (págs. 219-238). Zaragoza : Acribia.
- Villalobos-Salazar, J. (1985). Carcinogenicidad del *Pteridium aquilinum* y alta incidencia del cáncergástrico en Costa Rica. En *En: Rev Costarric Cienc méd* (págs. 131-139). <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rccm/v6n3/art5.pdf>.
- Wattiaux, M. A. (1994). *Lactancia y Ordeño*. Recuperado el 14 de Enero de 2013, de Composicion de la leche y valor nutricional: <http://babcock.wisc.edu/node/199>

ANEXOS

ANEXO 1. *Recolección de muestras de leche*



Figura 1.1 leche recolectada en frascos ámbar.

ANEXO 2. *Metodología para la obtención de Ptaquilósido en muestras de leche*

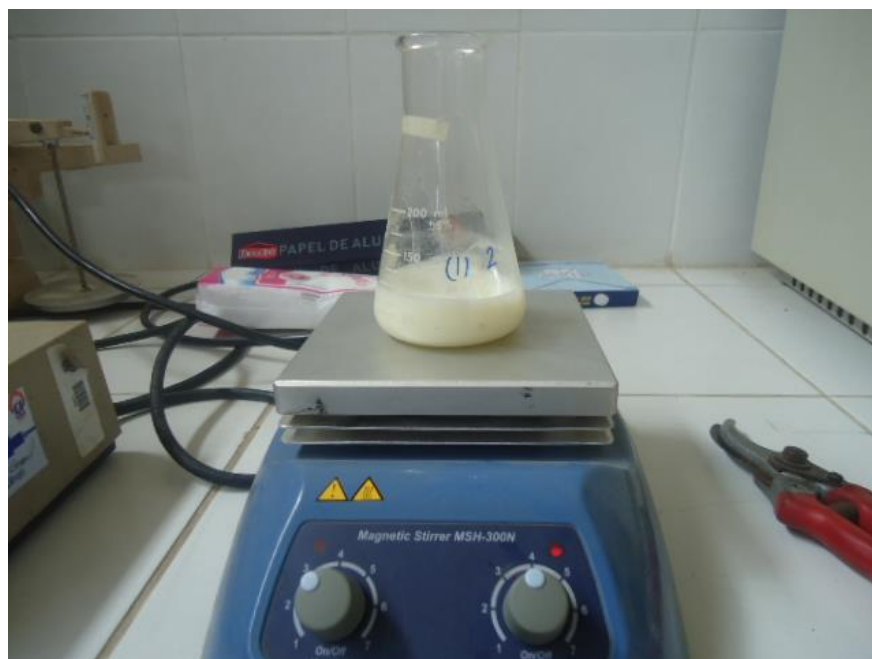


Figura 2.1 Precipitación de proteínas



Figura 2.2 Muestras de leche filtrada, libre de proteínas



Figura 2.3 Muestras de leche libre de proteínas y lípidos



Figura 2.4 Extracción de grasas en muestras de leche



Figura 2.5 Extracto de diclorometano concentrado a presión reducida en rotavapor a temperatura de 40°C

ANEXO 3. Identificación de ptaquilósido

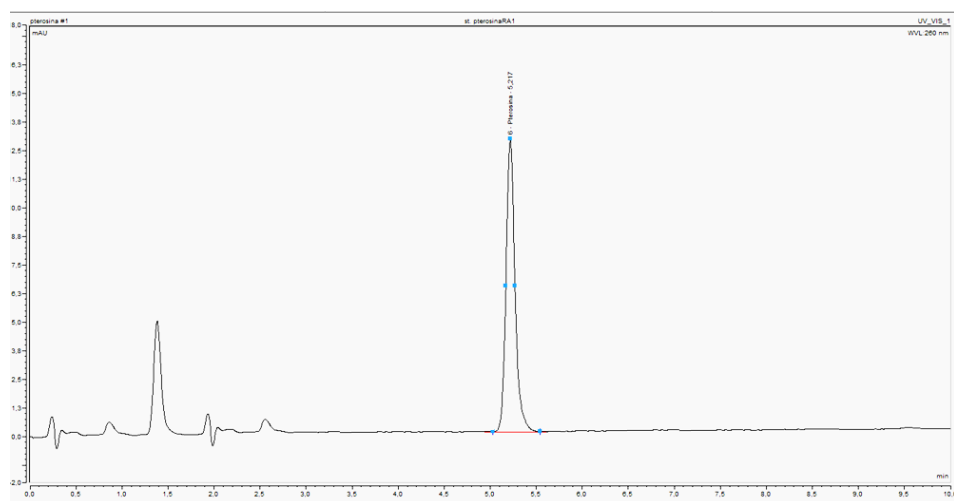


Figura 3.1 Cromatograma, estándar de ptaquilósido

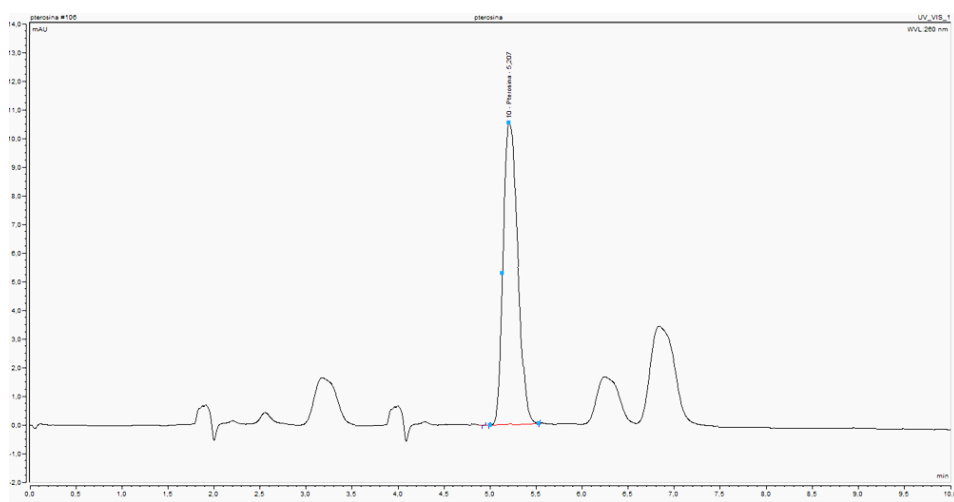


Figura 3.2 Cromatograma, muestra de leche con ptaquilósido

ANEXO 4. Cuantificación de ptaquilósido



Figura 4.1 Equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC, Dionex Ultimate 3000, mediante modo isocrático por columna de fase reversa

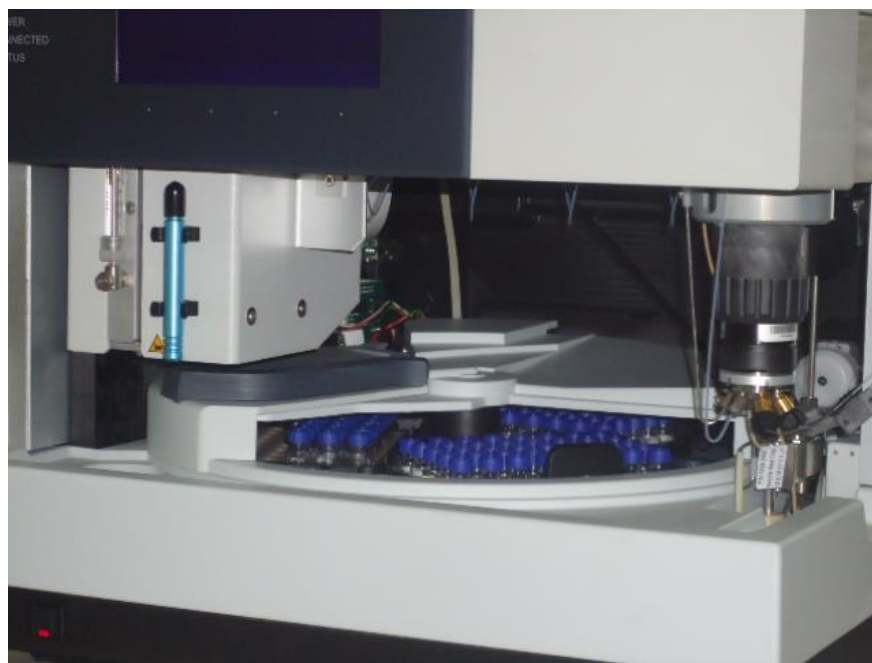


Figura 4.2 Viales de autosampler con el residuo de pterosina, para la cuantificación de ptaquilósido